



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Master Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement (BioMane)

Spécialité Microbiologie Environnementale et Sanitaire

Jodelle DEGOIS

Influence des conditions de traitement d'échantillons de bioaérosols sur les résultats de dosage des (1,3)- β -D-glucanes



Stage réalisé du 03.02.2014 au 31.07.2014

Sous la responsabilité de : Philippe DUQUENNE

Remerciements

Je remercie l'INRS de m'avoir accueillie au sein du département « Métrologie des polluants ».

Je remercie également Monsieur Peter Gorner, responsable du laboratoire de « Métrologie des aérosols » pour son accueil au sein du laboratoire ;

Monsieur Philippe Duquenne, docteur en bioaérosols et microbiologie, pour son aide tout au long du stage et sa contribution à l'amélioration de mes compétences scientifiques pratiques et théoriques ;

Madame Catherine Coulais, technicienne de laboratoire, pour sa contribution aux expérimentations, pour ses conseils techniques, pour sa patience et sa gentillesse ;

Mesdames Guylaine Greff-Mirguet et Véronique Koehler qui m'ont également conseillée pendant le stage.

Pour finir, je remercie toute l'équipe du laboratoire de « Métrologie des Aérosols » : Sébastien Bau, Alexis Boivin, Olivier Deloras, Raphaël Payet, Xavier Simon et Oliver Witschger pour leur accueil et leur bonne humeur.

Sommaire

1	Introduction	6
1.1	Présentation de l'INRS	6
1.1.1	Département métrologie des polluants	6
1.2	Objectifs du stage	6
1.3	Généralités sur les bioaérosols	7
1.4	Chimie et origine des glucanes	7
1.5	Activités biologiques des glucanes	8
1.6	Expositions professionnelles	8
1.7	Méthodes de mesure des glucanes	9
1.7.1	Méthodes de prélèvements	9
1.7.2	Méthodes de dosage	9
1.8	Traitements des échantillons	10
1.8.1	Traitements alcalins	10
1.8.2	Traitements thermiques	11
1.8.3	Sonication	11
1.8.4	Autres types de traitements	11
1.9	Organisation du stage	12
1.10	Choix des modèles d'étude et des prétraitements associés	13
2	Matériel et méthodes	14
2.1	Modèles utilisés	19
2.2	Préparation des suspensions cellulaires et des solutions de glucanes	19
2.2.1	Préparation des solutions de glucanes	19
2.2.2	Préparation des suspensions de <i>S. cerevisiae</i>	19
2.2.3	Préparation des suspensions de <i>P. brevicompactum</i>	19
2.3	Premiers essais de dosage sur les deux types de suspensions cellulaires et sur le matériel 15	
2.3.1	Essais de dosage de (1,3)- β -D-glucanes dans les suspensions de <i>S. cerevisiae</i> et <i>P. brevicompactum</i>	15
2.3.2	Essai de dosage des (1,3)- β -D-glucanes dans le matériel et solution utilisés pour l'étude 15	

2.4	Décontamination des billes et des flacons en verre	15
2.4.1	Décontamination par voie enzymatique.....	15
2.4.2	Décontamination aux UV	16
2.4.3	Décontamination aux ultrasons.....	16
2.4.4	Décontamination par sonication dans l'éthanol	16
2.5	Protocoles de traitement.....	16
2.5.1	Préparation.....	16
2.5.2	Applications des traitements aux suspensions cellulaires et aux solutions de glucanes 23	
2.5.3	Influence du pH du liquide de mise en suspension des (1,3)- β -D-glucanes sur leur dosage par le LAL.....	19
2.6	Analyse des échantillons	19
2.6.1	Dosage des (1,3)- β -D-glucanes	19
2.6.2	Mesure des microorganismes cultivables.....	19
2.6.3	Mesure du pH	20
2.6.4	Calculs statistiques	20
3	Résultats.....	21
3.1	Dosages préliminaires des (1,3)- β -D-glucanes dans les suspensions cellulaires et le matériel.....	21
3.1.1	Essais de dosage de (1,3)- β -D-glucanes dans les suspensions de <i>S. cerevisiae</i> et <i>P. brevicompectum</i>	21
3.1.2	Essais de dosage sur le matériel	21
3.2	Décontamination des billes et des flacons en verre	22
3.3	Effet des traitements sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes	22
3.3.1	Préparation.....	22
3.3.2	Applications des traitements aux suspensions cellulaires et aux solutions de glucanes 24	
3.3.3	Influence du pH du liquide de mise en suspension des (1,3)- β -D-glucanes sur leur dosage par le LAL.....	28
4	Discussion.....	30
	Références bibliographiques	35

Abréviations

CARSAT : caisses d'assurance retraite et de la santé au travail

CV : coefficient de variation

EIA : enzyme immunoassay

Eau p.p.i : eau Purifiée Pour Irrigation

INRS : insitut national de recherche et de sécurité

LAL: *Limulus amebocyte lysate*

MEA: malt extract agar

UE : unité enzymatique

YPD : yeast peptone dextrose

1 Introduction

1.1 Présentation de l'INRS

L'INRS est l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Il a été créé en 1947 sous le nom d'institut national de la sécurité (INS) et devient l'INRS en 1968. Il s'agit d'une association loi de 1901 et donc d'un organisme privé à but non lucratif qui emploie 632 personnes sur deux sites, un à Paris (siège social, 224 employés) et un en Lorraine à Vandœuvre-lès-Nancy (408 employés). L'INRS a pour mission de prévenir les accidents du travail et les maladies professionnelles. Pour ce faire, des activités de recherche et d'informations sont menées dans le but d'identifier les risques professionnels, d'analyser leurs conséquences sur la prévention de la santé et la sécurité des travailleurs et de développer des moyens de maîtrise de ces risques. Pour mener à bien ces objectifs, les missions sont organisées en trois axes : 1) études et recherche : anticiper les risques professionnels, 2) information : sensibiliser et d'informer les entreprises grâce à des supports de prévention, 3) assistance : accompagner les entreprises lorsqu'elles sont confrontées à des problèmes de sécurité et/ou de santé, 4) former les entreprises à la prévention des risques professionnels. Les activités de recherche quant à elles, sont réparties en plusieurs départements : épidémiologie en entreprise, ingénierie des équipements de travail, ingénierie des procédés, polluants et santé, homme au travail et métrologie des polluants.

1.1.1 Département métrologie des polluants

Ce stage a été réalisé dans le département « Métrologie des Polluants » et plus particulièrement dans le laboratoire de métrologie des aérosols qui évalue l'exposition professionnelle aux aérosols chimiques et/ou biologiques. Il s'intéresse aux propriétés physiques des aérosols, leur impact sur les voies respiratoires, développe et évalue des méthodes de mesures (prélèvements et analyses) de l'exposition aux aérosols.

1.2 Objectifs du stage

Ce stage s'intègre dans une étude (EL 2013-025), inscrite au programme d'études et recherches de l'INRS, qui a pour objectif de développer et d'évaluer une méthode de mesure des (1,3)- β -D-glucanes présents dans l'air des lieux de travail. Cette méthode pourrait ensuite être mise à la disposition des CARSATS dans le but d'évaluer l'exposition des travailleurs aux bioaérosols. L'étude comporte 4 étapes (figure 1) sur une durée prévisionnelle de 4 ans. Ce stage intervient dans le début de l'étape 3 qui vise à étudier plusieurs types de prétraitements des échantillons sur des modèles simples

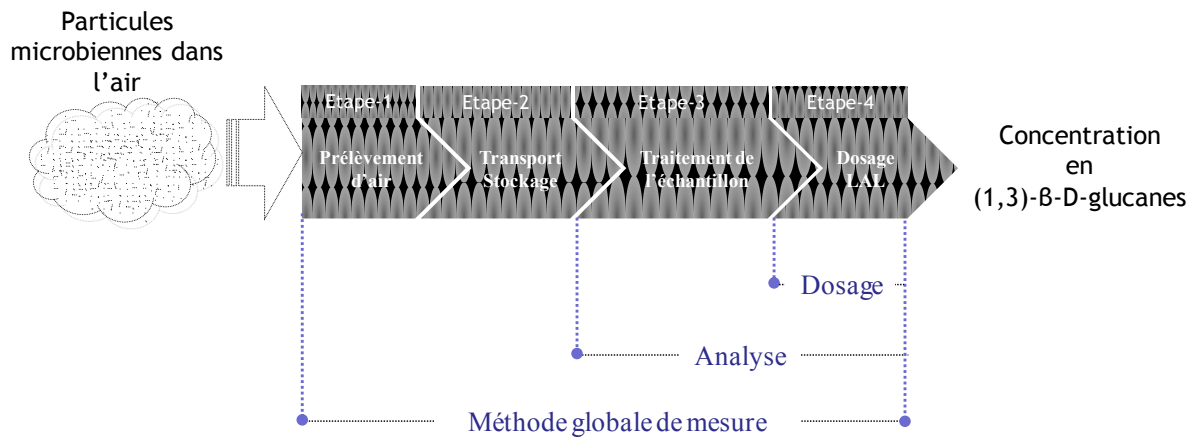


Figure 1 Schéma représentant les différentes étapes de l'étude portant sur la mesure des (1,3)-D-glucanes dans l'air

(glucanes purs en poudre ou souches cultivées en milieu liquide), dans le but d'optimiser la mesure des (1,3)- β -D-glucanes par le test au LAL.

1.3 Généralités sur les bioaérosols

Les bioaérosols sont des particules d'origine biologique en suspension dans l'air. Ils sont constitués d'organismes (débris de végétaux et d'animaux) et de micro-organismes vivants ou non (bactéries thermophiles, des spores de champignons, des bactéries Gram + et Gram -), intègres ou non, de constituants cellulaires, des endotoxines, des mycotoxines, glucanes et de composés organiques volatiles (Sykes *et al.*, 2011b).

1.4 Chimie et origine des glucanes

Les (1,3)- β -D-glucanes sont des polysaccharides appartenant à la famille des glucanes. Ce sont des polymères de D-glucose liés entre eux par des liaisons de type β . Il existe une grande variété de (1,3)- β -D-glucanes (tableau 1). Ils peuvent être présents sous formes linéaire, ramifiée ou cyclique. Les ramifications sont majoritairement de type (1,3)-(1,4)- β -D-glucanes (présents chez les plantes comme l'avoine ou l'orge) ou (1,3)-(1,6)- β -D-glucanes (présents chez les levures et moisissures). Des (1,3)-(1,2)- β -D-glucanes sont également retrouvés (Laroche and Michaud, 2007). Les (1,3)- β -D-glucanes existent sous différentes conformations, « random coil », simple hélice ou triple hélice. En fonction de la conformation du glucane, la réponse au dosage ne sera pas la même. La structure tridimensionnelle et la fonction biologique des (1,3)- β -D-glucanes varient selon l'organisme. Ces molécules sont produites par les champignons, certaines bactéries ou encore des végétaux. Ils sont donc présents chez les eucaryotes et les procaryotes. Ce sont des constituants majeurs de la paroi cellulaire qui peuvent représenter 50-60 % du poids sec de la paroi chez les levures ou les moisissures. Ils sont liés à d'autres macromolécules comme des protéines ou des lipides. Le rôle des (1,3)- β -D-glucanes est essentiel puisqu'ils interviennent dans le maintien de la rigidité et de l'intégrité de la paroi cellulaire (Bowman and Free, 2006). Les (1,3)- β -D-glucanes ont différentes propriétés physico-chimiques. La solubilité des (1,3)- β -D-glucanes dépend de la structure et notamment de la longueur de la chaîne ainsi que du degré de ramification (Laroche and Michaud, 2007). Le curdlan (1,3)- β -D-glucane linéaire (Foto *et al.*, 2004), qui est sous forme de triple hélice, est insoluble dans l'eau et dans la plupart des solutions organiques mais il est soluble dans la soude, le DMSO, l'acide formique, et les réactifs aprotiques. Tandis que les (1,3)-(1,6)- β -D-glucanes cycliques retrouvés chez les symbiontes des légumineuses *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium loti* et *Azorhizobium caulinodans* sont solubles dans l'eau. Le passage d'une forme à une autre est possible selon les traitements utilisés (figure 2) (McIntosh *et al.*, 2005).

Tableau 1 Liste non exhaustive de (1,3)- β -D-glucanes étudiés dans la littérature

glucanes	organisme	origine	conformation	Référence
Curdlan	<i>Alicagenes faecalis</i>	bactérie	β -(1,3)-glucan	Foto, Plett <i>et al.</i> 2004
Laminarin	<i>Laminaria digitata</i>	algue	β -(1,3)(1,6)-D-glucan	Foto, Plett <i>et al.</i> 2004
Glucan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	levure	85% β -(1,3)-glucan 15% β -(1,6)-glucan	Foto, Plett <i>et al.</i> 2004
Mannan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	levure	α -(1,2)(1,3)(1,6)-glucan	Foto, Plett <i>et al.</i> 2004
Pustulan	<i>Umbilicaria papulosa</i>	lichen	β -(1,6)-glucan	Foto, Plett <i>et al.</i> 2004
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	bactérie	α -(1,6)(1,3)(1,4)(1,2)-glucan	Foto, Plett <i>et al.</i> 2004
Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	champignons	β -(1,3)(1,6)-D-glucan	Mueller, Raptis <i>et al.</i> 2000
Scleroglucan	<i>Sclerolsium rolfsii</i>	champignons	β -(1,3)(1,6)-D-glucan	Mueller, Raptis <i>et al.</i> 2000
Glucan	Barley	plante	β -(1,4)(1,3)-glucan	Mueller, Raptis <i>et al.</i> 2000
Glucan	<i>Aspergillus versicolor</i>	moisissure		Seo, Reponen <i>et al.</i> 2008
Glucan	<i>Stachybotrys chartarum</i>	moisissure		Seo, Reponen <i>et al.</i> 2008
Grifolan	<i>Grifola frondosa</i>	champignon	β -(1,3)(1,6)-D-glucan	Thorn, Beijer <i>et al.</i> 2001
Letinan	<i>Letinus edodes</i>	champignon	β -(1,3)(1,6)-D-glucan	Young, Jones <i>et al.</i> 1998
Paramylon	<i>Euglena gracilis</i>	protiste flagellé	β -(1,3)- D-glucan	Cherid, Foto <i>et al.</i> 2011
Pullulan			α -(1,4)(1,6)-D-glucan	Cherid, Foto <i>et al.</i> 2011
Carboxymethylcurldan		bactérie	β -(1,3)- D-glucan	Douwes, Doekes <i>et al.</i> 1996
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	levure	Extrait de β -glucane et de mannane	Rylander 2010
Glucan-chitin	<i>Aspergillus niger</i>	moisissure		Sandula, Kogan <i>et al.</i> 1999

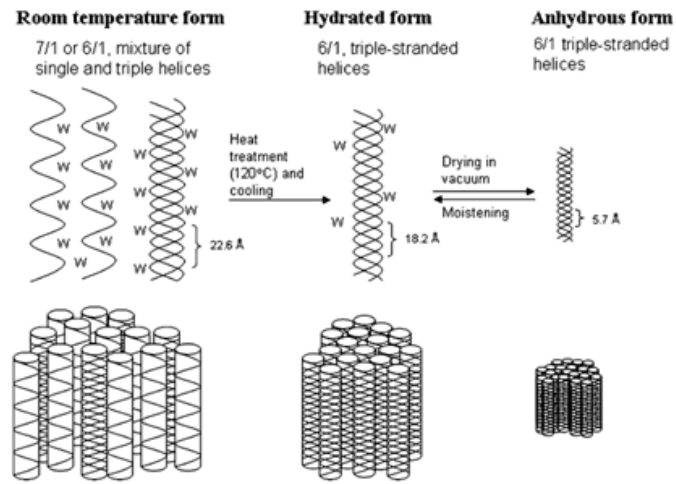


Figure 2 Représentation des différentes structures de (1,3)- β -D-glucanes selon les températures. Figure tirée de (McIntosh, Stone et al. 2005).

1.5 Activités biologiques des glucanes

Les glucanes peuvent avoir une activité à la fois bénéfique et néfaste pour la santé humaine. L'absorption par voie orale ou sanguine est généralement bénéfique tandis que les effets néfastes surviennent lors de l'inhalation.

De part leurs propriétés rhéologiques, ils sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour leurs propriétés gélifiantes, émulsifiantes et sensorielles (ils sont insipides, inodores et incolores). Les glucanes sont également utilisés en médecine. En effet, les glucanes provenant de céréales auraient un impact sur la régulation de la cholestérolémie et de la glycémie tandis que ceux provenant des moisissures, levures et bactéries auraient des effets anti tumoraux et augmenteraient la résistance aux infections bactériennes et virales. En cosmétique, ils entrent de la formulation de certains produits (Laroche and Michaud, 2007; Young *et al.*, 1998).

Cependant, l'inhalation de (1,3)- β -D-glucanes peut induire l'irritation des voies aériennes supérieures ou des muqueuses (Bønløkke *et al.*, 2006). D'autres effets ont été observés chez les salariés exposés : augmentation de la prévalence de l'atopie, production de myeloperoxydase, diminution du volume expiratoire exhalé. Les glucanes ont un potentiel inflammatoire mais ne sont pas considérés comme des allergènes. Le caractère pathogène des β -glucanes vient de leur capacité à moduler une variété de réactions immunitaires par activation des macrophages, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes-T ainsi que les cellules NT (Ławniczek-Wałczyk and Górny, 2010). Ils activent les cellules du système immunitaire inné en se liant à des récepteurs spécifiques comme le récepteur Dectin-1 ou à d'autres récepteurs de la membrane cellulaire. Les propriétés biologiques des glucanes ne sont pas liées à la viabilité des organismes qui les contiennent, puisque les glucanes provenant d'organismes morts ou vivants ont les mêmes propriétés. Les (1,3)- β -D-glucanes ont un potentiel inflammatoire moins important que les endotoxines bactériennes mais ils sont présents en plus grande quantité dans l'environnement ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de poussière pour les glucanes et $\text{ng}/\mu\text{g}$ de poussière pour les endotoxines). Les glucanes sont considérés comme des bons indicateurs de l'exposition fongique même si la relation entre l'inhalation de (1,3)- β -D-glucanes et les effets néfastes sur la santé n'est pas encore bien établie (Noss *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2008).

1.6 Expositions professionnelles

Les (1,3)- β -D-glucanes ont été retrouvés dans plusieurs environnements professionnels (tableau 2). Cette exposition est mesurée par le biais de différentes méthodes de prélèvement et d'analyse

Tableau 2 Exemple de mesure des (1,3)- β -D-glucanes, présents dans l'air, dans différents environnements professionnels.

Source	Environnement	Méthode de prélèvement	Milieu de collecte	Niveau d'exposition
Menetrez <i>et al</i> , 2009	air intérieur et extérieur	DEKATI Low-Pressure Impactor	Filtre PTFE	<u>Air intérieur</u> 5,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ <u>Air extérieur</u> 8,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Thorn <i>et al.</i> , 1998	déchets ménagers	Personal sampler equipment	Filtres Isopore (ATTP 0,8 μm)	2,0 à 13,7 ng/m^3
Foto <i>et al</i> 2004	air extérieur (campus universitaire)	CFC (37 mm)	Membrane polycarbonates (37 mm ; 0,4 μm)	7,42 ng/m^3
Foto <i>et al</i> 2005	air intérieur (living room)	BUCK model SS sampling pump	Filters polycarbonates (37 mm; 0,4 μm) Accrodisc filters (13 mm; 0,45 μm)	0,04 à 20,55 ng/m^3
Ahikari <i>et al</i> 2011	serres ornementales	Button inhalable aerosol sampler	Membrane polycarbonates (25 mm; 2,0 μm)	<u>Hiver</u> 2294 ng/m^3 <u>Été</u> 191,4 ng/m^3
Singh <i>et al</i> 2011	air intérieur (habitation), fermes	Cyclone sampler (BC12)	Membrane polycarbonate (37 mm ; 0,8 μm) + tube microcentrifugation	<u>Ferme</u> 1,80.10 ³ ng/m^3 <u>Habitation</u> 1,91.10 ³ ng/m^3
Thorn, 2001	collecte des déchets ménagers	Filtration (open filter cassettes)	Membrane polycarbonate (0,8 μm)	10,4 ng/m^3
Rylander <i>et al</i> 1999	papeterie		Isopore filters (0,8 μm)	96 ng/m^3
Gladding <i>et al</i> 2003	usines de récupérations de matériaux	Buck Sampling Pumps	open filter cassettes polycarbonates (37mm ; 0,8 μm)	24,4 ng/m^3
Mandryk <i>et al</i> ,1999	scieries	Casella-seven-hole Samplers ; Higgins-cyclone samplers	Filtre polycarbonate (25 mm; 0,8 μm)	1,55 ng/m^3
Elfman <i>et al</i> 2009	écuries	Filtration (closed filter cassettes)	Filtre polycarbonate	362 ng/m^3

(paragraphe ci-dessous). Ces niveaux d'exposition sont très variables selon les milieux d'exposition mais également selon les saisons, l'emplacement de la mesure (air intérieur ou air extérieur) ainsi que selon d'autres paramètres. Il n'existe pas à ce jour de valeur limite d'exposition professionnelle pour les (1,3)- β -D-glucanes.

1.7 Méthodes de mesure des glucanes

1.7.1 Méthodes de prélèvements

L'analyse bibliographique (tableau 2) montre qu'il existe une grande variété de moyen de prélèvement des glucanes dans l'air. Les auteurs font soit des prélèvements d'ambiance soit des prélèvements individuels pour déterminer l'exposition réelle du personnel exposé. De plus, plusieurs type d'échantillonneurs sont utilisés comme les échantillonneurs PAS6 ou GSP (Sander *et al.*, 2008; Wouters *et al.*, 2006). D'autres auteurs prélèvent de la poussière et génèrent par la suite des aérosols à partir desquels seront dosés les glucanes (Seo *et al.*, 2009; Adhikari *et al.*, 2010). La conservation des échantillons n'a pas été étudiée.

1.7.2 Méthodes de dosage

Plusieurs méthodes de dosage des glucanes sont disponibles. Les plus utilisées dans la bibliographie sont les méthodes au LAL (Limulus amebocyte lysate) et l'EIA (enzyme immunoassay).

1.7.2.1 La méthode EIA

La méthode EIA (Enzyme Immunoassay) utilise la reconnaissance spécifique entre un anticorps et son antigène. L'anticorps est obtenu à partir d'un sérum de lapin (Douwes *et al.*, 1996b) immunisé avec du sérum bovin contenant de l'albumine conjuguée à de la laminarine (glucane). L'anticorps est couplé à une peroxydase qui est détectée à 492 nm pour estimer la quantité de glucanes. Elle permet de doser les (1,3)- β -D-glucanes linéaires ou ramifiés (Douwes *et al.*, 1996b). La limite de détection de cette méthode est environ de 40 ng.mL⁻¹. Cette méthode n'est pas commercialisée.

1.7.2.2 La méthode au LAL

Cette méthode est fondée sur la capacité naturelle du sang de Limule à coaguler en présence d'endotoxines ou de (1,3)- β -D-glucanes. Les deux composés activent une voie différente, les endotoxines activent le facteur C alors que les (1,3)- β -D-glucanes activent le facteur G. Le kit GlucateLL[®] dose spécifiquement les (1,3)- β -D-glucanes (Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA), la voie des endotoxines est inactivée (figure 3). Une serine protéase zymogène appelée le facteur G et

Voie inactivée

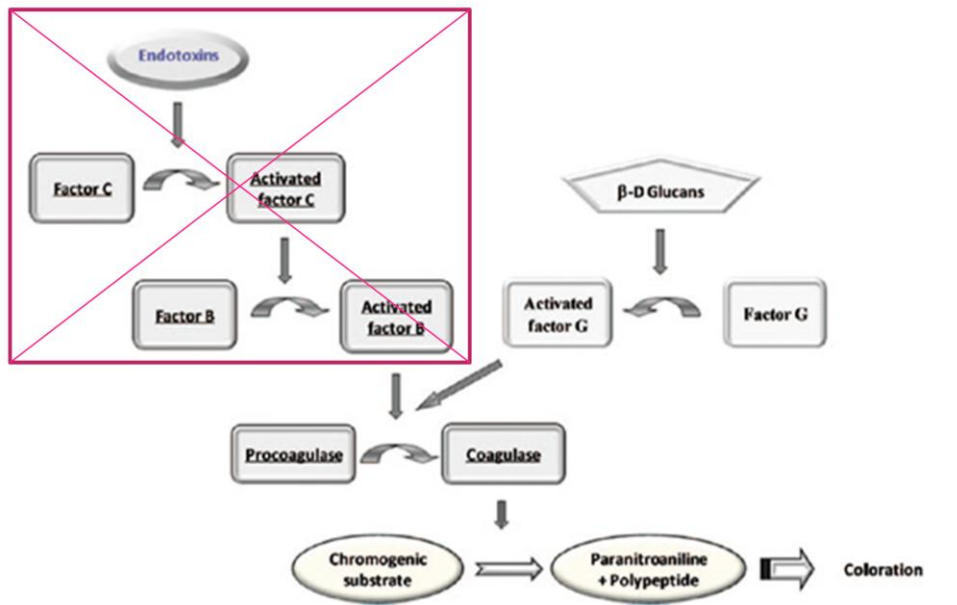


Figure 3 Réactions enzymatiques en cascade du test LAL activées par les β -(1,3)-D-glucanes, la voie des endotoxines étant inactivée. Ces réactions conduisent à la formation de paranitroaniline qui absorbe à 405 nm (figure inspirée de Duquenne *et al.* 2013).

activée par le beta-glucane déclenche la cascade de coagulation. L'enzyme de coagulation clive le substrat, le ρ -nitroanilide couplé à un peptide. Ce composé est un chromogène qui prend une couleur jaune lorsque le peptide est clivé par la sérine protéase. L'absorbance est déterminée à 405 nm (Ławniczek-Wałczyk and Górny, 2010). La sensibilité du test au LAL est meilleure que celle de l'EIA. En effet, elle permet de détecter jusqu'à $3,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de glucanes (limite de détection préconisée du test GlucateLL®). Il existe plusieurs tests utilisant la méthode LAL. Dans cette étude, c'est le test en cinétique chromogénique qui est utilisé. La coloration observée est fonction de la concentration en (1,3)- β -D-glucanes présents. La densité optique à 405 nm est mesurée à intervalles de temps réguliers, la microplaque étant maintenue à 37°C au cours des différentes lectures. Il y a détermination du temps de réaction qui correspond au temps pour que la densité optique atteigne 0,03 (Dawson, 1995). Ce temps de réaction est inversement proportionnel à la concentration de (1,3)- β -D-glucanes présents dans l'échantillon.

1.8 Traitements des échantillons

Les glucanes sont souvent traités avant leur dosage, quelque soit la méthode de dosage. Plusieurs types de traitements ont été mis en œuvre dans la littérature. Les plus employés ainsi que la raison de leur utilisation sont présentés ci-dessous.

1.8.1 Traitements alcalins

Le traitement alcalin (utilisation de NaOH) est le traitement le plus utilisé dans la littérature. Il aurait l'avantage de réduire les faux positifs ainsi que les faux négatifs en inhibant les sérines protéases endogènes et les inhibiteurs de sérines protéases (Ławniczek-Wałczyk and Górny, 2010). Cependant, les protocoles utilisés ne sont pas standardisés du point de vue de la concentration, du temps d'exposition mais également de l'éventuelle neutralisation de la solution. Ainsi pour les bioaérosols de terrain, les concentrations en NaOH les plus fréquentes sont de 0,3 N (Madsen *et al.*, 2012; Wu and Yao, 2010; Thorn *et al.*, 1998); 0,5 N (Foto *et al.*, 2005) et 0,6 N (Seo *et al.*, 2009; Adhikari *et al.*, 2011). Pour une concentration de 0,5 N de NaOH un temps d'hydrolyse de 2,5 h serait optimal (Foto *et al.*, 2004). Cette équipe a également testé l'influence éventuelle de la neutralisation avec du TrisHCl et celle de la congélation sur la réactivité au LAL. Il en résulte qu'aucun des paramètres n'a modifié les résultats de dosage. L'étude a été menée sur plusieurs types de glucanes purifiés : laminarin, dextran, mannan, pustulan et curdlan. La nature du glucane a une influence majeure sur le dosage. En effet, ce test ne réagit pas en présence d'anomères α tels que le mannan ou le dextran, il ne reconnaît pas non plus les (1,3)-(1,2)- β -D-glucanes et détecte moins bien les (1,3)-(1,6)- β -D-glucanes même après traitement alcalin (Foto *et al.*, 2004). La méthode LAL permet de détecter les (1,3)- β -D-

glucanes sous forme de simple hélice. Or, comme mentionné précédemment, les (1,3)- β -D-glucanes fongiques sont majoritairement sous forme de triple hélice. La concentration en (1,3)- β -D-glucanes mesurée dans les échantillons de bioaérosols est donc sous-estimée. Pour améliorer le dosage, l'objectif est de convertir les triples hélices en simples hélices.

1.8.2 Traitements thermiques

Après traitement thermique, les (1,3)- β -D-glucanes sont généralement dosés par la méthode EIA et non par le test au LAL (Wouters *et al.*, 2005; Samadi *et al.*, 2009; Douwes *et al.*, 2000). Tous les protocoles décrivent un autoclavage pendant 60 min à 120°C. Cependant, l'efficacité de ce traitement se pose. En effet, d'après Douwes et son équipe (Douwes *et al.*, 1996a), le traitement thermique augmenterait le rapport triples hélices/ simples hélices ce qui est le contraire du résultat recherché. De plus, ce type de traitement augmente la viscosité des β -(1,3)-D-glucanes linéaires (curdlan) entraînant la formation d'un gel instable et résistant à la plupart des β -D-glucanases (Laroche and Michaud, 2007).

1.8.3 Sonication

La sonication est également utilisée. Elle est parfois précédée d'une étape de solubilisation dans l'eau (Adhikari *et al.*, 2010) ou dans une solution alcaline (Šandula *et al.*, 1999). La sonication serait une bonne méthode de solubilisation des (1,3)- β -D-glucanes puisqu'elle ne change pas la nature des polymères, mais réduit leur poids moléculaire en cassant certaines liaisons. Ce traitement permettrait également de réduire la viscosité des (1,3)- β -D-glucanes sur le long terme. (Šandula *et al.*, 1999). La sonication suivi de « spray drying » pourrait éviter l'agrégation des microparticules de glucanes dans les milieux aqueux alors que les traitements acides (HCl 2N) ou basiques (NaOH 2N) ne le permettent pas (Hunter *et al.*, 2002).

1.8.4 Autres types de traitements

D'autres traitements sont utilisés dans la littérature. Par exemple, le traitement par micro-ondes dans un récipient haute pression qui permettrait d'augmenter la dispersion des (1,3)- β -D-glucanes dans l'eau (Wang *et al.*, 2002). Les traitements enzymatiques sont rarement utilisés. Il apparaît selon Roslansky et Novitsky (Roslansky and Novitsky, 1991) que la laminarinase (EC 3.2.1.6) de *Penicillium sp.* et la cellulase (EC 3.2.1.4) d'*Aspergillus niger* combinées à un traitement alcalin diminuerait la réactivité au test au LAL de la laminarine ((1,3)-(1,6)- β -D-glucanes) de 25%. Ils en déduisent que la conformation et le degré de polymérisation des glucanes auraient un impact sur leur

réactivité au LAL. Une deuxième étude portant sur les traitements enzymatiques utilise un complexe enzymatique extrait d'*Actinomyces Rutgersensis* (Javmen *et al.*, 2012). Les prétraitements sont généralement réalisés sur les échantillons mais, le prétraitement du filtre de prélèvement des bioaérosols est également envisagé.

La contamination des filtres peut être limitée par un prétraitement des filtres par sonication dans l'éthanol (Shogren and Park, 2011). L'eau apyrogène est également utilisée pour extraire les (1,3)- β -D-glucanes des filtres (Fogelmark and Rylander, 1997) avant leur dosage par le test au LAL (Kanamori *et al.*, 2009). Cependant, comme mentionné précédemment, certains (1,3)- β -D-glucanes et plus particulièrement les (1,3)- β -D-glucanes linéaires sont insolubles dans l'eau. L'extraction des filtres peut être améliorée par l'addition de détergents comme le Tween 80 (Lee and Liao, 2014; Reponen *et al.*, 2010) ou le Tween 20 (Sykes *et al.*, 2011a; Chew *et al.*, 2001).

La recherche bibliographique a permis de constater qu'il n'existe pas de similitudes dans les protocoles de prétraitements ni sur les matrices utilisées. En effet, plusieurs traitements sont utilisés sans qu'il y ait un protocole standard. Les matrices les plus utilisées sont des bioaérosols prélevés avec différentes méthodes, des glucanes purs en poudre, des souches fongiques pures ou des graines pour les glucanes provenant de l'orge ou de l'avoine. La quantité initiale de matrice n'est pas non plus homogène. Les différences de protocoles de prétraitement, de dosage et d'origine de (1,3)- β -D-glucanes posent la question de la significativité des résultats. Les (1,3)- β -D-glucanes mesurés dans un article ne correspondent pas nécessairement à ceux mesurés dans une autre. Ceci démontre l'intérêt d'une méthode standardisée qui permettrait de faire des comparaisons sur les niveaux d'exposition en (1,3)- β -D-glucanes sur différents milieux professionnels à condition que cette méthode soit représentative des glucanes à doser.

1.9 Organisation du stage

Le stage s'est déroulé en plusieurs étapes. La première étape a été de recenser un maximum d'informations présentes dans la littérature concernant le dosage des (1,3)- β -D-glucanes, leurs moyens de prélèvement mais également leurs impacts sur la santé de l'homme, leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques. Cette étape a permis de présélectionner une liste de prétraitements à tester ainsi que les différents modèles. La faisabilité des traitements a été ensuite vérifiée mettant en évidence des complications sous-jacentes. Une fois la mise en application des traitements validée, l'étude a été dimensionnée (mise en place du plan d'expérience). Les dernières étapes ont été de tester l'influence des prétraitements sélectionnés sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL sur des modèles simples, l'analyse des résultats avec une phase de rédaction et de synthèse.

1.10 Choix des modèles d'étude et des prétraitements associés

Suite à la recherche bibliographique, il est apparu que la structure et la nature du glucane ont une influence sur la réactivité au test au LAL. Devant cette constatation, 5 modèles ont été choisis dans le cadre de ce stage : trois (1,3)- β -D-glucanes purs en poudre et deux souches de microorganismes. Le choix des glucanes purs en poudre s'est porté sur la laminarine, un (1,3)-(1,6)- β -D-glucane provenant de *Laminaria digitata* (algue) ; le schizophyllan, un (1,3)-(1,6)- β -D-glucane provenant de *Schizophyllum commune* (champignon) ; un mélange de glucanes provenant de l'orge, majoritairement des (1,3)-(1,4)- β -D-glucanes. Ce choix permet d'étudier des glucanes ayant différentes structures et de différentes origines. Ceci a pour objectif être le plus représentatif possible de la variété de glucanes retrouvée sur le terrain. Les deux souches sélectionnées proviennent de la collection du laboratoire, il y a un modèle levure, *Saccharomyces cerevisiae* et un modèle de moisissure, *Penicillium brevicompactum*.

Ces cinq modèles vont subir différents traitements. Dans un premier temps, dix prétraitements, répartis en trois catégories, ont été choisis pour le stage : 1) les traitements physiques : broyage cellulaire, lyophilisation, sonication, traitement thermique. 2) les traitements enzymatiques : ajout de cellulase, de lysozyme. 3) les traitements chimiques : traitements alcalins, détergent (Tween 80), solvant aprotique (DMSO). Ce nombre de prétraitements a été réduits ensuite au nombre de 5 dans un souci de faisabilité. Les prétraitements réalisés lors de ce stage sont broyage cellulaire, sonication, traitement thermique, traitements alcalins, détergent (Tween 80). La sélection s'est portée sur les traitements réalisables en routine et donc faciles à mettre en œuvre et peu onéreux. Une phase préliminaire dans l'expérimentation a été nécessaire pour pouvoir mettre en place les protocoles précis en termes de concentration de réactif (traitement alcalin, Tween 80), de choix de matériel (verrerie pour le traitement thermique, choix de la taille et de la matière des billes de lyse pour le broyage cellulaire...) et de barèmes (temps et puissance des ultrasons pour la sonication...).

Les prétraitements sélectionnés ont plusieurs objectifs : convertir les triples hélices en simples hélices (traitement alcalin), dissoudre les agrégats de (1,3)- β -D-glucanes solubles (sonication), ou rendre accessibles les (1,3)- β -D-glucanes ancrés dans la paroi au test au LAL (traitements mécanique, thermique, chimique). Les prétraitements ont également pour objectif majeur d'améliorer la solubilité des (1,3)- β -D-glucanes. Ce paramètre apparaît comme limitant dans les mesures de glucanes dans l'air étant donné le caractère insoluble de la plupart des glucanes.

2 Matériel et méthodes

2.1 Modèles utilisés

Les souches utilisées comme modèles microbiens proviennent de la collection du laboratoire. *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC2601, CIP,) a été choisi comme le modèle de levure et *Penicillium brevicompactum* (UMIP2338.96, CRBIP,) comme modèle de moisissure. Trois modèles de glucanes purs en poudre ont également été utilisés : 1) des glucanes de l'orge (glucan from barley, Sigma-Aldrich, USA), 2) la laminarine (de laminaran from *Laminaria digitata*, Sigma-Aldrich, USA), 3) le shizophyllan (schizophyllan from *Schizophyllum commune*, Invivogen, USA).

2.2 Préparation des suspensions cellulaires et des solutions de glucanes

La préparation des suspensions et des solutions a été identique pour toutes les étapes de l'étude.

2.2.1 Préparation des solutions de glucanes

Les modèles de glucanes purifiés sont présents sous forme de poudre. Une masse de 5 mg a été pesée puis réhydratée dans 10 mL d'eau à 55°C. La concentration initiale de la suspension était de 0,5 mg/mL. Cette suspension mère a été diluée à 1000 pg/mL dans de l'eau p.p.i (eau purifiée pour irrigation, B.Braun, Allemagne) puis est immédiatement utilisée pour les essais.

2.2.2 Préparation des suspensions de *S. cerevisiae*

La souche de *S.cerevisiae* (sortie de la collection du laboratoire : conservation à -80°C) a été repiquée sur une boîte de Pétri (milieu YPD, composition annexe 1) et incubée pendant 48 h à 37°C. A partir de cette culture, une suspension de *S. cerevisiae* a été préparée dans une solution de tryptone sel (composition Annexe 1). Dans une fiole de 100 mL, 25 mL de milieu YPD ont étéensemencés avec 2 mL de la suspension initiale ($DO_{600nm}=0,5$). La culture liquide a été mise à incuber pendant 48 h à 37°C sous une agitation de 160 rpm. La culture fraîche a été lavée deux fois dans 20 mL d'eau p.p.i (centrifugation pendant 7 minutes à 3000 rpm entre chaque lavage).

2.2.3 Préparation des suspensions de *P. brevicompactum*

La souche (sortie de la collection du laboratoire : conservation à -80°C) de *P. brevicompactum* a été repiquée sur 5 boîtes de Pétri (milieu MEA ; composition Annexe1). Après incubation pendant 7 jours à 25°C, la surface de chaque boîte a été frottée avec un écouvillon afin de prélever les spores qui ont été remises en suspension dans 10 mL d'eau p.p.i. La solution obtenue a été filtrée de façon passive avec un fritté de porosité 2 stérile dans une fiole à vide stérile. Le fritté a été rincé avec 5 mL d'eau p.p.i puis le volume a été complété à 20 mL finaux. Le filtrat a été centrifugé pendant 7 min à 7000 rpm. Le culot a été re-suspendu dans 20 mL d'eau p.p.i puis vortexé. La DO_{600nm} a été ajustée à 0,3 (standardisation des essais) puis la suspension a été utilisée pour les essais.

2.3 Premiers essais de dosage sur les deux types de suspensions cellulaires et sur le matériel

2.3.1 Essais de dosage de (1,3)- β -D-glucanes dans les suspensions de *S. cerevisiae* et *P. brevicompactum*

Les suspensions de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et de moisissures (*Penicillium brevicompactum*) ont été préparées comme mentionné ci-dessus. Deux essais avec des dilutions différentes ont été réalisés. Les (1,3)- β -D-glucanes dans ces échantillons ont été dosés par la méthode au LAL avec le kit GlucateLL[®].

2.3.2 Essai de dosage des (1,3)- β -D-glucanes dans le matériel et solution utilisés pour l'étude

Tous les traitements décrits ci-dessous ont été réalisés exactement dans les mêmes conditions, avec de l'eau p.p.i au lieu des suspensions et solutions, pour évaluer la concentration initiale en (1,3)- β -D-glucanes présents dans le matériel. Les essais ont été réalisés avec trois répétitions.

2.4 Décontamination des billes et des flacons en verre

Différents essais ont été réalisés dans le but de décontaminer le matériel utilisé lors du broyage cellulaire (billes de lyse) et de l'autoclavage (flacons de lyophilisation). Un lot de flacons contaminés a été constitué en introduisant les billes de verre d'un tube de lysing matrix C (lysing matrix C, tube 15 mL, mpbio, USA) dans un flacon de lyophilisation en verre (20 mL vial serum type I clear glass, Wheaton, USA) bouché. Les essais de décontamination ont été réalisés avec trois répétitions sur les flacons contaminés de ce lot. Le mode opératoire global est représenté dans la figure 4.

2.4.1 Décontamination par voie enzymatique

Les échantillons ont été traités avec une β -glucanase provenant d'*Aspergillus niger* (Sigma Aldrich, USA, n° CAS : 9074-98-0). L'enzyme présente un pH optimal de 5,5, une température optimale de 55°C et une activité enzymatique¹ de 1 UE/mg (données fournisseur). La solution enzymatique a été préparée (à 5 UE/ mL) en suspendant 5 mg de poudre (balance de précision AE168, Mettler Toledo, Suisse) dans 1 mL d'eau p.p.i (Eau p.p.i, B. Braun, France). Les flacons contaminés ont été complétés avec 20 ml d'eau p.p.i et 10 μ l de la solution d'enzyme à 5 UE/ mL ont été ajoutés. Les flacons contaminés ont ensuite été fermés avec une feuille d'aluminium puis plongés pendant 3 heures dans un bain marie à 55°C. Au terme cette incubation, le liquide a été éliminé puis les flacons et les billes ont été séchés dans une étuve pendant 2 heures à 250°C. Les billes ont ensuite été transvasées dans des tubes vides de 15 mL (Cellstar[®] centrifuge tubes, Greiner Bio-One, Allemagne),

¹ Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qu'il faut pour libérer une μ mol de glucose par minute à température et pH optimaux à partir de β -glucanes.

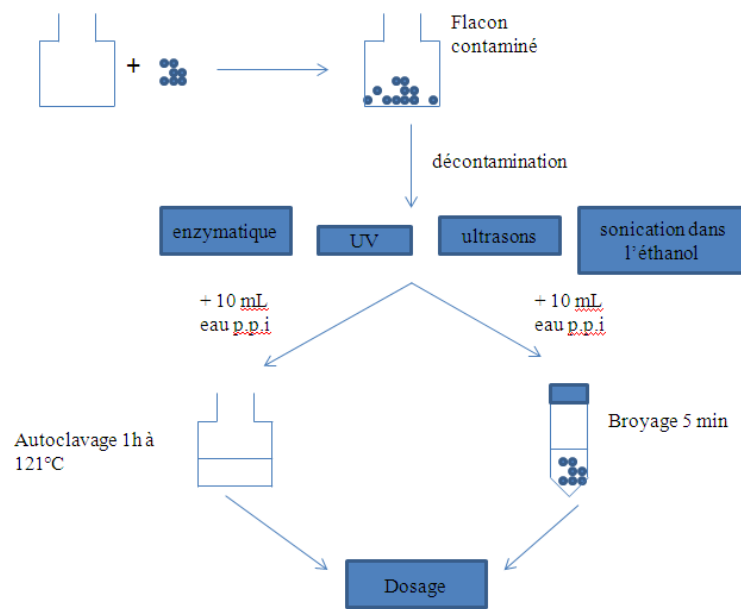


Figure 4 Mode opératoire global de l'essai de décontamination des flacons de lyophilisation et des billes de lyse

validés pour l'étude glucanes. Les flacons sans billes ont été obstrués avec leurs bouchons préalablement autoclavés (121°C, 15 minutes).

2.4.2 Décontamination aux UV

Les flacons contaminés ont été exposés à de la lumière UV (PSM Heresafe KS18, Thermo Electron Led, France) pendant 1 heure. Ils ont ensuite été entreposés dans une étuve à 250°C pendant 2 heures (chaleur sèche). A la fin du traitement, les billes ont ensuite été transvasées dans des tubes vides de 15 mL (Cellstar® centrifuge tubes, Greiner Bio-One, Allemagne), validés pour l'étude glucanes. Les flacons sans billes ont été obstrués avec leurs bouchons préalablement autoclavés (121°C, 15 minutes).

2.4.3 Décontamination aux ultrasons

Les flacons contaminés ont été plongés dans un bain à ultrasons (Elmasonic S 30 (H), IMLAB, France) à 280 W et à 37 kHz pendant 30 minutes. Après ce temps, les flacons contaminés ont été chauffés à 250°C pendant 2 heures (chaleur sèche). A la fin du traitement, les billes ont été transvasées dans des tubes vides de 15 mL (Cellstar® centrifuge tubes, Greiner Bio-One, Allemagne), validés pour l'étude glucanes. Les flacons sans billes ont été obstrués avec leurs bouchons préalablement autoclavés (121°C, 15 minutes).

2.4.4 Décontamination par sonication dans l'éthanol

Les flacons contaminés ont été complétés avec 25 ml d'éthanol absolu puis plongés dans un bain à ultrasons (Elmasonic S 30 (H), IMLAB, France) à 280 W et à 37 kHz pendant 120 minutes. Les flacons contaminés sont ensuite lavés avec de l'eau p.p.i (3 rinçages), les flacons contaminés sont mis sous agitation orbitale 1 min entre chaque lavage. Le liquide a été éliminé puis les flacons et les billes ont été séchés dans une étuve pendant 2 heures à 250°C. Les billes ont été transvasées dans des tubes de 15 mL.

Après la décontamination, un volume de 10 mL d'eau p.p.i a été ajouté dans les flacons. L'ensemble a été traité par autoclavage (1 heure, 121°C). Le même volume d'eau p.p.i est ajouté dans les tubes de 15 mL contenant les billes de lyse. L'ensemble est traité par broyage cellulaire pendant 5 minutes. Après traitements, l'eau p.p.i est analysée avec le kit GlucateLL®.

2.5 Protocoles de traitement

2.5.1 Préparation

Plusieurs protocoles de traitement ont été retenus pour étudier l'effet du traitement sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL

2.5.1.1 Essais de neutralisation

Des essais de neutralisation d'une solution de NaOH 0,3 N ont été menés par le biais d'un tampon Tris (pH=7,6) d'une part et d'une solution de HCl 2N d'autre part. Un volume de 20 mL de solution de NaOH 0,3N a été préparé ($\text{pH}_{\text{initial}}=13,184$). Cette solution a été neutralisée soit par un tampon de Tris-HCl 1N (pH=7,601), soit par une solution de HCl 2N. Pour les deux essais, l'évolution du pH est suivie par pH-métrie (pH-mètre SevenMulti, Mettler Toledo, Suisse).

2.5.1.2 Influence de la neutralisation sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL

L'influence de la neutralisation sur le dosage a été testée. Une solution de (1,3)- β -D-glucanes de référence (le pachyman pour le kit GlucateLL[®]) connue ($25 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a été mise en solution dans une solution de NaOH à 0,3 N final. Un aliquot a été neutralisé avec de l'HCl 0,3 N, un deuxième aliquot n'a pas été neutralisé, un troisième aliquot a été traité uniquement à l'HCl 0,3 N. Enfin, un témoin non traité a également été testé. Les différents aliquots ont ensuite été analysés avec le kit GlucateLL[®] pour mesurer la concentration en glucanes.

2.5.1.3 Traitement par ultrasons : détermination du barème temps

Les suspensions de levures et de moisissures ont été préparées comme mentionné ci-dessus.

Le traitement des suspensions cellulaires aux ultrasons et l'analyse de leur distribution granulométrique ont été réalisés avec le Mastersizer 3000 (Malvern) avec une puissance de ultrasons 40 W. Le bruit de fond a été mesuré par ajout de 80 mL d'eau miliQ. Les différents échantillons ont ensuite été ajoutés jusqu'à l'obtention d'une obscuration du laser acceptable. La $D_x 10$ est la valeur de taille pour laquelle 90% des microorganismes ont une taille supérieure (relative aux petits microorganismes). Une proportion de 50% des microorganismes a une taille supérieure à la $D_x 50$ et 10% des microorganismes ont une taille supérieure à la $D_x 90$ (relative aux gros microorganismes). Un deuxième bain à ultrasons à 280 W (Elmasonic S 30 (H), IMLAB, France) a été testé. Le mode opératoire détaillé est présenté dans la figure 5.

Les différents paramètres du granulomètre sont présentés dans le tableau 3, les différents traitements appliqués aux suspensions sont décrits dans les tableaux 4 et 5.

2.5.2 Applications des traitements aux suspensions cellulaires et aux solutions de glucanes

2.5.2.1 Plan d'expérience et déroulement des essais

Pour tous les traitements et dans un souci d'homogénéité, le volume de suspension diluée était de 6 mL complété à 12 mL. Pour les modèles en poudre, un volume de 10 mL de suspension ($1000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a été traité, sauf pour le traitement alcalin où 1 mL de suspension ($10^4 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a été dilué dans 5,99 mL d'eau p.p.i. Pour tous les modèles et tous les traitements, les essais ont été réalisés avec quatre répétitions. Pour tous les modèles et facteurs de dilution, l'ensemble des traitements a été réalisé en

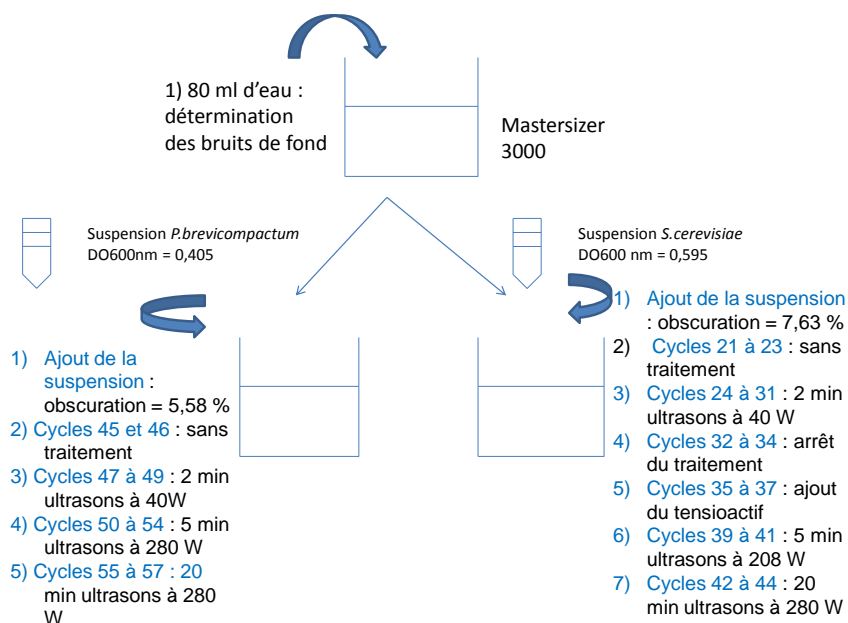


Figure 5 Mode opératoire réalisé lors du suivi de la dispersion granulométrique en fonction de la durée du traitement de sonication pour les deux modèles microbiens : *S.cerevisiae* et *P.brevicompectum*

Tableau 3 Paramètres du granulomètre pour chaque type de suspension cellulaire

Souche	Obscuration du laser	Indice de réfraction des particules	Indice d'absorption des particules
<i>P.brevicompectum</i>	5,58 %	1,550	0,100
<i>S.cerevisiae</i>	7,63 %	1,520	0,001

Tableau 4 Conditions de traitement appliquées selon le numéro du cycle de mesure granulométrique de la suspension de *S.cerevisiae*

N° du cycle	conditions
21→23	Sans traitement
24→31	Traitement ultrasons 40 W
32→34	Arrêt du traitement
35→37	Ajout de tensioactif, pas d'ultrasons
39→41	5 min dans le bain à ultrasons (280W)
42→44	20 min dans le bain à ultrasons (280 W)

Tableau 5 Conditions de traitement appliquées selon le numéro du cycle de mesure granulométrique de la suspension de *P.brevicompectum*

N° du cycle	conditions
45→46	Sans traitement
47→49	2 min aux ultrasons (40W)
50→54	5 min dans le bain à ultrasons (280 W)
55→57	20 min dans le bain à ultrasons (280 W)

même temps, pour un modèle et un facteur de dilution donnés. L'ensemble de toutes les répétitions a été dosé dans une même microplaque. Le mode opératoire est schématisé par la figure 6.

2.5.2.2 Traitement par broyage cellulaire

Le broyage a été effectué avec des billes de verre décontaminées de 1 mm de diamètre (lysing matrix C, tube 15 mL, mpbio, USA). Les billes avaient été préalablement décontaminées avec le protocole décrit dans le paragraphe 2.4.3. Les solutions et suspensions ont été ajoutées dans les tubes de 15 mL contenant les billes puis ont été soumises à une agitation (Fastprep, mpbio, USA) pendant 5 cycles de chacun 1 min à une vitesse de $4,0 \text{ m.s}^{-1}$. Les suspensions et solutions ont été ensuite analysées (dosage des glucanes et dénombrement des cultivables pour les suspensions cellulaires).

2.5.2.3 Traitement par autoclavage

Les suspensions et solution ont été autoclavées (Laboster, Subtilcrépieux S.A, France) pendant 1h à 121°C dans des flacons de lyophilisation préalablement décontaminés (protocole décrit dans le paragraphe 2.4.3). Les suspensions et solutions ont été ensuite analysées (dosage des glucanes).

2.5.2.4 Traitement par sonication

Les quatre répétitions de suspensions et solutions ont été plongées dans un bain à ultrasons pendant 5 min (bain à ultrasons Elmasonic S 30 (H), IMLAB, France). Les suspensions et solutions ont été ensuite analysées (dosage des glucanes et dénombrement des cultivables pour les suspensions cellulaires).

2.5.2.5 Traitement par solution alcaline

Pour les suspensions cellulaires, les 6 mL de suspensions ont été dilués dans 2,59 mL d'eau p.p.i. Un volume de 1,80 mL de solution NaOH 2N (0,3 N final) a été ajouté et laissé en contact avec les suspensions pendant 1heure avec agitation de 2000 rpm (agitateur multireax, Heidolph, Allemagne). Ensuite, la suspension a été neutralisée avec 1,61mL de solution HCl 2N. Pour les glucanes purs, 1 mL de solution concentrée à 10^4 pg/mL a été dilué dans 5,99 mL d'eau p.p.i puis traité par 1,67 mL de solution NaOH 2N (0,3 N final). Après agitation pendant 1h, ils ont été neutralisés avec 1,34 mL de solution HCl 2N. Les suspensions et solutions ont été ensuite analysées (dosage des glucanes et mesure du pH).

2.5.2.6 Traitement dans une solution Tween 80

Les échantillons ont été traités avec une solution au Tween 80 à 0,1% puis soumis à une agitation de 2000 rpm pendant 1 heure (agitateur multireax, Heidolph, Allemagne). Les suspensions et solutions sont ensuite analysées (dosage glucanes).

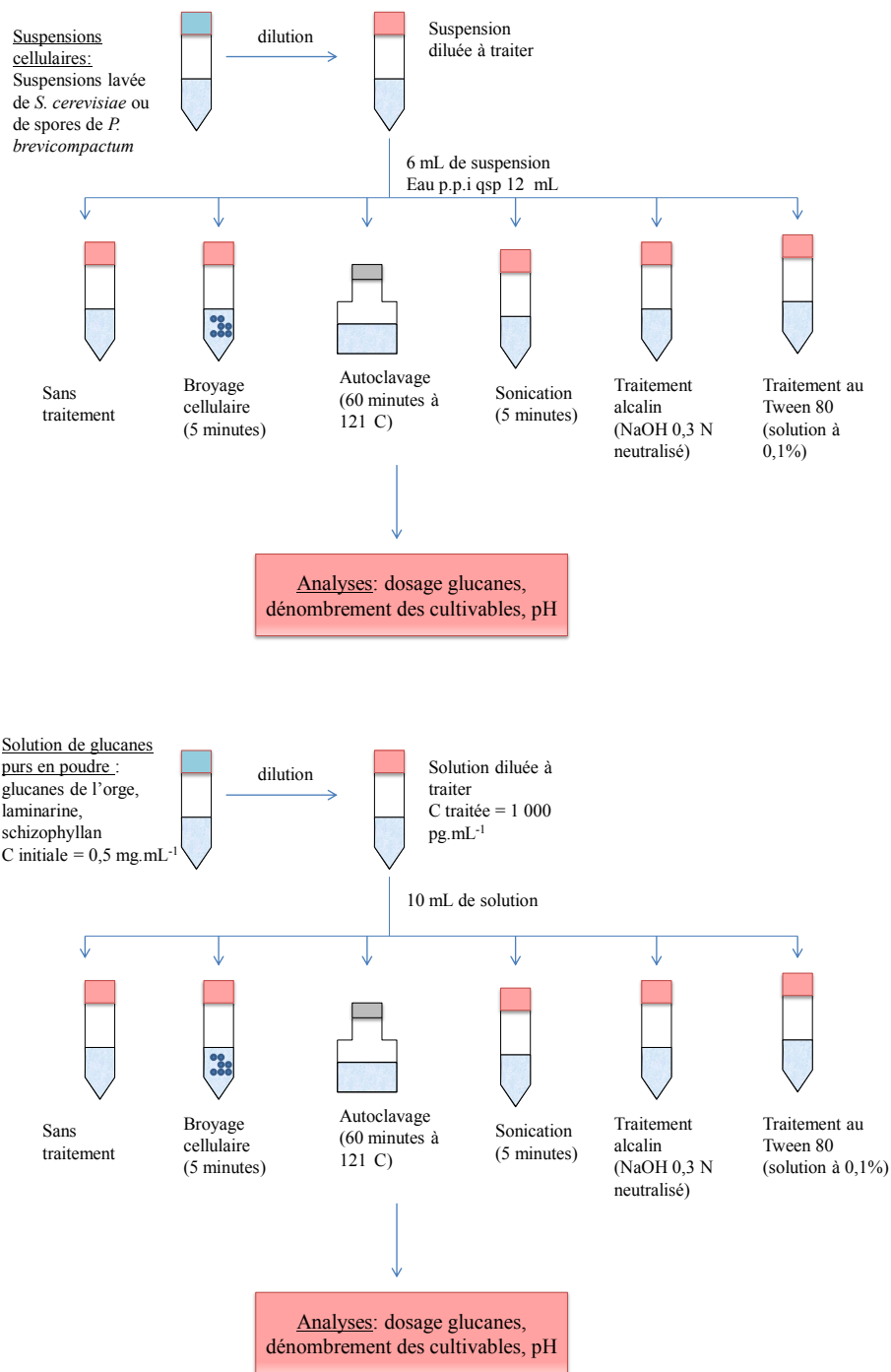


Figure 6 Mode opératoire de l'essai sur l'influence des traitements sur le dosage des (1,3)-β-D-glucanes par le kit GlucateII®. Deux modèles de suspensions cellulaires (*S. cerevisiae* et *P. brevicompactum*) et trois glucanes purs en poudre (glucanes de l'orge, laminarine et schizophyllan) ont été testés. L'essai a été réalisé avec quatre répétitions.

2.5.3 Influence du pH du liquide de mise en suspension des (1,3)- β -D-glucanes sur leur dosage par le LAL

La suspension de *S. cerevisiae* et la solution de laminarine ont été préparées et diluées comme décrit précédemment. Deux lots de suspension de levures ont été préparés. Dans le premier, les 6 mL de suspension ont été complétés avec 6 mL d'eau p.p.i et avec 6 mL de tampon PBS (Annexe 1) dans le deuxième. Pour chaque lot, quatre répétitions ont été traitées par broyage seul, quatre répétitions par broyage suivi d'un traitement au Tween 80 et quatre répétitions n'ont pas été traitées. Les analyses ont ensuite été effectuées. Les traitements suivent exactement le même protocole que décrit précédemment. Pour la solution de laminarine, quatre répétitions ont été solubilisées dans de l'eau p.p.i et quatre répétitions l'on été dans du tampon PBS. Les analyses ont été effectuées sans traitement. Pour chaque répétition, le pH a été évalué.

2.6 Analyse des échantillons

2.6.1 Dosage des (1,3)- β -D-glucanes

Les dosages ont été réalisés avec le kit GlucateLL® (Lot GK14001, Associates of Cape Cod, INC, UK) à l'aide du lecteur de microplaques (ELx808, BioTek, France) et du logiciel Gen5 (BioTek, France), selon les instructions du fabricant. Pour ce dosage, le pachyman est le glucane de référence. Il a été utilisé pour établir la gamme étalon du dosage. La concentration en (1,3)- β -D-glucanes des suspensions et solutions a été calculée en fonction de la réponse du pachyman au LAL. Après ajout des solutions à doser et de la gamme étalon, la microplaque de 96 puits a été mise à incuber 10 min à 37°C avant l'ajout le réactif. Pour chaque répétition, deux mesures de concentrations ont été effectuées dans deux puits adjacents.

2.6.2 Mesure des microorganismes cultivables

Le dénombrement des levures et moisissures cultivables a été effectué selon le principe suivant : deux boîtes ont été inoculées avec 100 μ L de suspension traitée par étalement de trois dilutions successives. Les dilutions ont été réalisées en cascade au 1/10 dans du TS. L'étalement des levures a été réalisé sur milieu gélosé YPD et les boîtes ont été incubées pendant 48 h à 37°C. Le comptage des colonies a été réalisé après 24 et 48 h d'incubation. Celui des moisissures a été réalisé sur milieu gélosé MEA avec une incubation pendant 72h à 25°. La concentration en microorganismes cultivables est calculée par la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n1+0,1n2)d}$$

Avec

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient 15 colonies ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en mL ;

n1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution

n2 est le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue

2.6.3 Mesure du pH

Le pH des solutions a été contrôlé avec du papier pH (MColorpHast : gamme : 6,5-10,0 ; 4,0-7,0 ; Merck ; Allemagne).

2.6.4 Calculs statistiques

Les calculs statistiques ont été effectués avec le logiciel StatGraphics (StatGraphics Centurion XVI version 16.2, Statpoint technologie, INC, USA). La concentration en (1,3)- β -D-glucanes est une variable ne suivant pas une loi normale même après transformation logarithmiques. Les tests statistiques effectués sur cette variable sont des tests non paramétriques. Le dénombrement de la flore cultivable suit une loi normale après transformation logarithmique et la distribution granulométrique est une variable gaussienne. Sur ces deux variables, les tests statistiques effectués sont des tests paramétriques.

3 Résultats

3.1 Dosages préliminaires des (1,3)- β -D-glucanes dans les suspensions cellulaires et le matériel

3.1.1 Essais de dosage de (1,3)- β -D-glucanes dans les suspensions de *S. cerevisiae* et *P. brevicompactum*

Les concentrations en (1,3)- β -D-glucanes mesurées sont en dessous de la limite de détection de la méthode pour les suspensions de *S. cerevisiae* et *P. brevicompactum* aux niveaux de dilution de 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} .

Pour *S. cerevisiae*, une concentration de $8,46 \pm 6,75$ pg.mL⁻¹ a été mesurée au niveau de dilution 10^{-4} , de $7,56 \pm 4,18$ pg.mL⁻¹ pour une dilution de 10^{-5} et de $7,71 \pm 1,17$ pg.mL⁻¹ pour une dilution de 10^{-6} (figure 7). Il n'y a pas d'effet significatif de la dilution sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par le réactif GlucateLL (Kruskall et Wallis : $p=0,86$; $\alpha=0,05$). Les coefficients de variations sont importants, ils sont compris entre 79,85% et 15,24%.

Pour *P. brevicompactum*, une concentration de $20,20 \pm 4,75$ pg.mL⁻¹ a été mesurée pour une dilution de 10^{-2} , de $4,93 \pm 0,86$ pg.mL⁻¹ pour une dilution de 10^{-3} et de $3,94 \pm 1,90$ pg.mL⁻¹ pour une dilution de 10^{-4} . Il y a une différence significative entre la concentration mesurée à la dilution 10^{-2} et les deux autres dilutions (Kruskall et Wallis : $p=0,60$; $\alpha=0,05$). En revanche, les concentrations mesurées dans les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} sont statistiquement identiques.

Pour la suite des essais, les suspensions de *S. cerevisiae* seront diluées par des facteurs 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} tandis que les suspensions de *P. brevicompactum* seront diluées par des facteurs 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} .

3.1.2 Essais de dosage sur le matériel

Le dosage effectué dans les témoins négatifs a montré l'absence de (1,3)- β -D-glucanes détectables dans les traitements par ultrasons, alcalin et Tween 80 (figure 8). Les billes de lyse contiennent $7,78 \pm 5,46$ pg.mL⁻¹ tandis que les flacons en contiennent $10,04 \pm 6,21$ pg.mL⁻¹. Les billes utilisées pour le broyage cellulaire et les flacons de lyophilisation utilisés pour l'autoclavage sont contaminés par une quantité non négligeable de (1,3)- β -D-glucanes. Ils doivent donc être décontaminés.

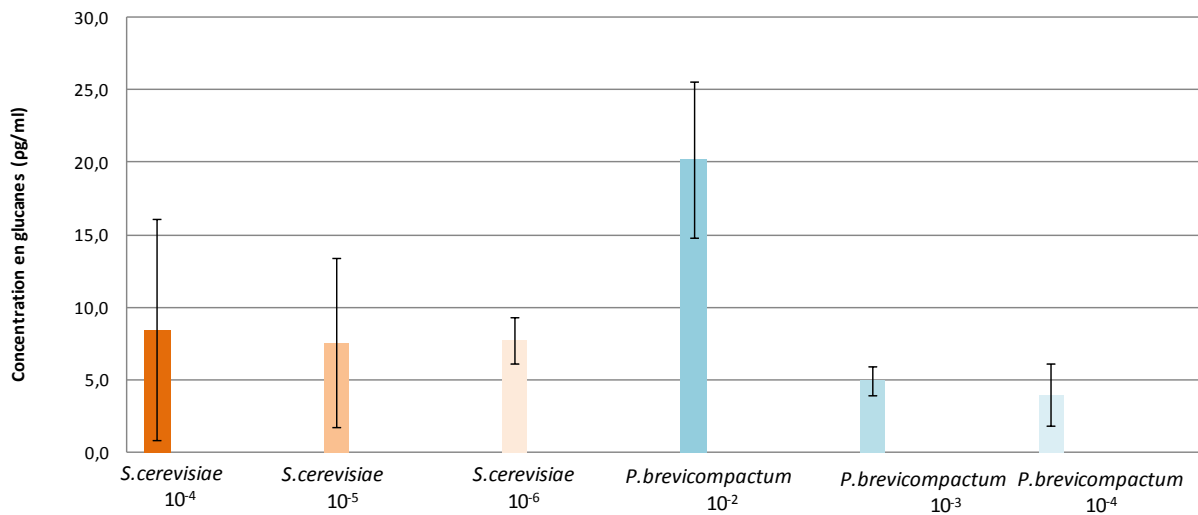


Figure 7 Concentration en (1,3)-β-D-glucanes (pg.mL⁻¹) mesurée dans les suspensions diluées de *S. cerevisiae* et *P. brevicompactum*. Les valeurs indiquent la moyenne des trois répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

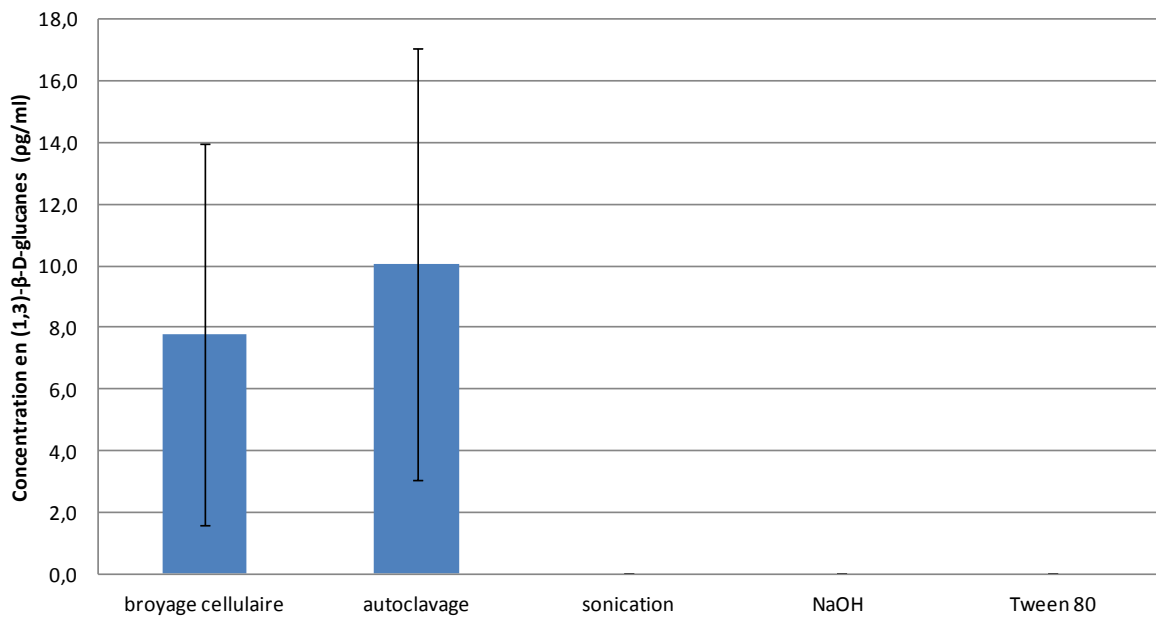


Figure 8 Concentration en (1,3)-β-D-glucanes mesurée (pg.mL⁻¹) après traitement de l'eau p.p.i. Les valeurs correspondent à la moyenne de 4 répétitions et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%.

3.2 Décontamination des billes et des flacons en verre

Les différentes méthodes testées pour la décontamination se sont révélées inefficaces pour les flacons de lyophilisation (figure 9). La décontamination par sonication pendant 2 heures dans l'éthanol réduit significativement la concentration en (1,3)- β -D-glucanes à $10,02 \pm 3,46 \text{ pg.mL}^{-1}$ par rapport à l'absence de traitement ($96,28 \pm 39,22 \text{ pg.mL}^{-1}$) (Test de Levene ; $p=0,0001$; $\alpha=0,05$). Cependant, il semblerait que les flacons non traités aient été anormalement contaminés par rapport aux essais précédents. L'efficacité réelle de la décontamination se pose. Par ailleurs, l'analyse statistique a montré qu'il n'y a aucune différence significative entre les différents moyens de décontamination (Kruskall et Wallis ; $p=0,32$; $\alpha=0,05$). Les (1,3)- β -D-glucanes présents dans les flacons de lyophilisation sont donc résistants aux différents moyens mis en œuvre pour la décontamination du matériel.

Pour les billes de lyse, une seule méthode de décontamination s'est révélée efficace, la sonication pendant 2h dans l'éthanol (figure 10).

Au vue de ces résultats, la décontamination par sonication dans l'éthanol sera utilisée pour la décontamination des billes et des flacons lors de l'essai sur l'influence des prétraitements sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL.

3.3 Effet des traitements sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes

3.3.1 Préparation

3.3.1.1 Essais de neutralisation

Le pH initial de la solution de NaOH 0,3 N est de 13,184. Après ajout de 50 mL de tampon TrisHCl 1N (pH=7,6). Le pH diminue à 8,231 (figure 11). La neutralité n'a pas pu être atteinte dans ces conditions qui sont décrites par plusieurs auteurs (Foto *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2010). Au vue de ces résultats, cette méthode de neutralisation n'est pas envisageable.

L'essai de neutralisation de la solution de NaOH 0,3 N avec une solution de HCl 0,3 N a montré que la neutralité peut être atteinte dans les conditions suivantes :

$$\blacktriangleright V_{\text{HCl ajouté}} = 0,13 * V_{\text{NaOH 0,3 N}}$$

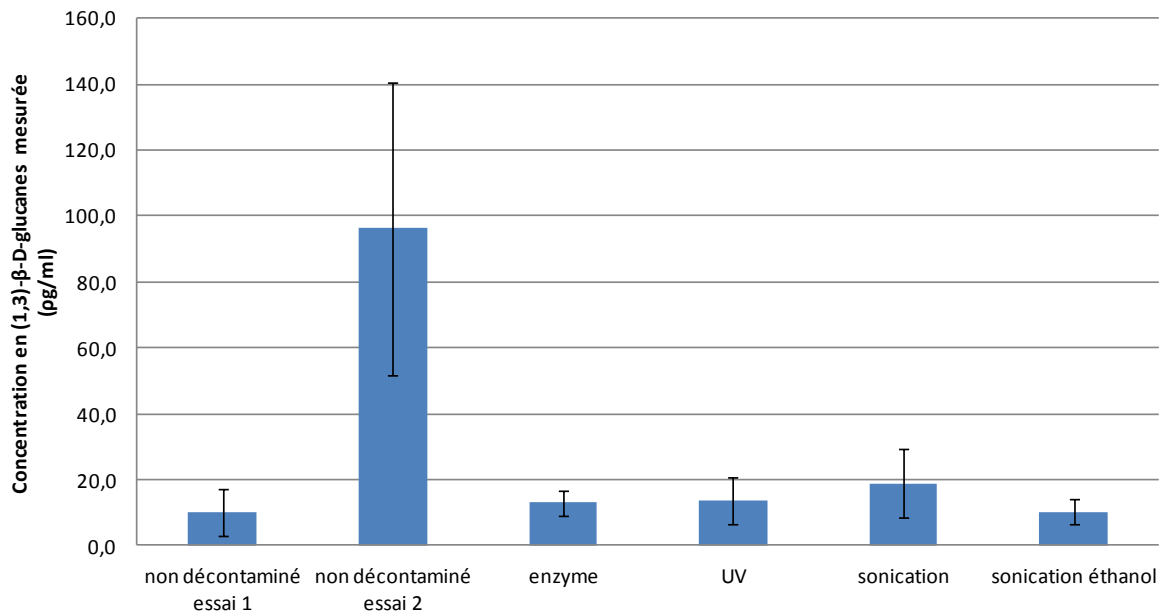


Figure 9 Concentration en (1,3)-β-D-glucanes résiduels mesurée (pg.mL⁻¹) après autoclavage des flacons en verre, décontaminés par différents modes opératoires. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%.

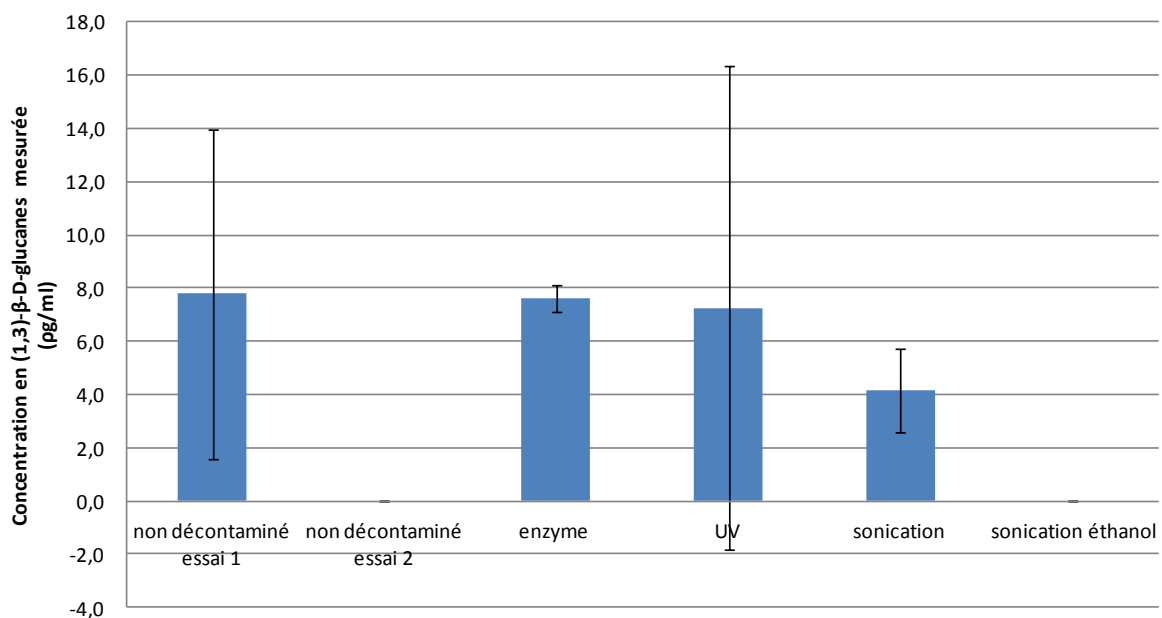


Figure 10 Concentration en (1,3)-β-D-glucanes résiduels mesurée (pg.mL⁻¹) après utilisation des billes de lyse dans le broyeur cellulaire, décontaminées par différents modes opératoires. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%.

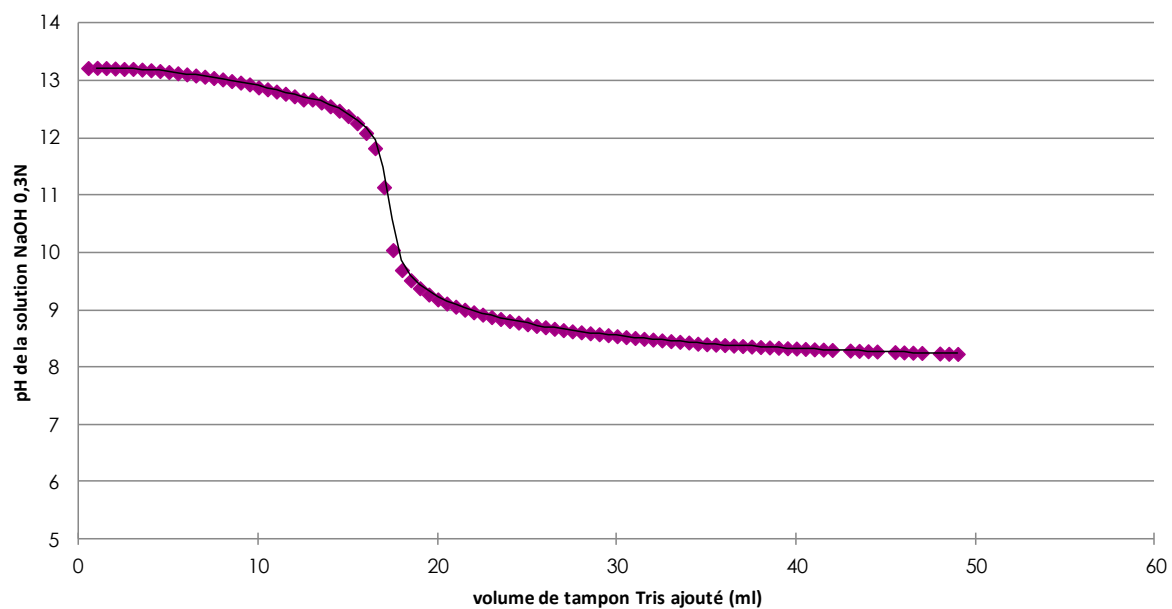


Figure 11 Evolution du pH d'une solution de NaOH 0,3 N en fonction du volume de tampon TrisHCl (pH=7,6) ajouté dans l'optique de neutraliser la solution alcaline.

Dans le cadre de l'étude, la neutralisation de la solution alcaline sera réalisée avec une solution de HCl 2N.

Le traitement alcalin fait partie des prétraitements de l'étude. Il y a un réel impact de la neutralisation sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes (Mann-Whitney ; $p=0,021$; $\alpha=0,05$). En l'absence de traitement, la concentration en pachyman mesurée est de $21,68 \pm 0,72$ pg.mL⁻¹. Avec neutralisation, la concentration en pachyman mesurée est en moyenne de $14,18 \pm 1,16$ pg.mL⁻¹ et diminue à $2,63$ pg.mL⁻¹ en milieu acide ou basique (figure 12). Pour le pachyman, le dosage est plus sensible sans traitement alcalin. La concentration réelle en pachyman est de 25 pg.mL⁻¹. Le dosage du pachyman dissout dans l'eau a un rendement de 87 %. Ce rendement diminue à 65% après traitement du pachyman avec la solution alcaline neutralisée et à 9,5% après ajout d'une solution de HCl 0,3 N ou d'une solution de NaOH 0,3 N.

Lors des essais sur l'influence du traitement alcalin sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par le LAL, les échantillons seront neutralisés avant le dosage.

3.3.1.2 Traitement par ultrasons : détermination du barème temps

Pour *S. cerevisiae*, avant traitement, la population de levure est mono dispersée (figures 13). Cette population a donc une taille homogène. Après 5 minutes de traitement aux ultrasons (280 W), la distribution granulométrique est toujours mono dispersée mais avec une taille inférieure à celle avant traitement. Le traitement a permis de diminuer la taille des agglomérats de levures et notamment la Dx 10 (Dx 10 est la valeur de taille pour laquelle 90% des microorganismes ont une taille supérieure, elle est relative aux petits microorganismes) (figure 14). Après arrêt du traitement aux ultrasons, la distribution granulométrique ne varie pas, il n'y a pas de ré agglomération des particules de levures. L'ajout d'un tensioactif n'a eu d'influence sur la distribution granulométrique. Un traitement aux ultrasons de 20 minutes (280 W) a été également testé. Il n'y a pas de différence du profil granulométrique après traitement de 5 ou de 20 minutes (Student ; $p=0,091$; $\alpha=0,05$).

Pour *P. brevicompactum*, la population fongique est poly dispersée avant traitement (figure 15). La population fongique est hétérogène en termes de taille. Après 5 min de traitement aux ultrasons (280 W), la distribution granulométrique des particules fongiques est toujours poly dispersée mais la proportion de particules de petites tailles est augmentée. En effet la Dx 90 diminue (la Dx 90 est la valeur de taille pour laquelle 10% des particules ont une taille supérieure) fortement (figure 16). Il y a probablement eu dé agglomération des particules fongiques après ce traitement. Il n'y a pas de différence significative entre les distributions granulométriques après 5 ou 20 min d'ultrasons à 280 W (Student ; $p=0,24$; $\alpha=0,05$).

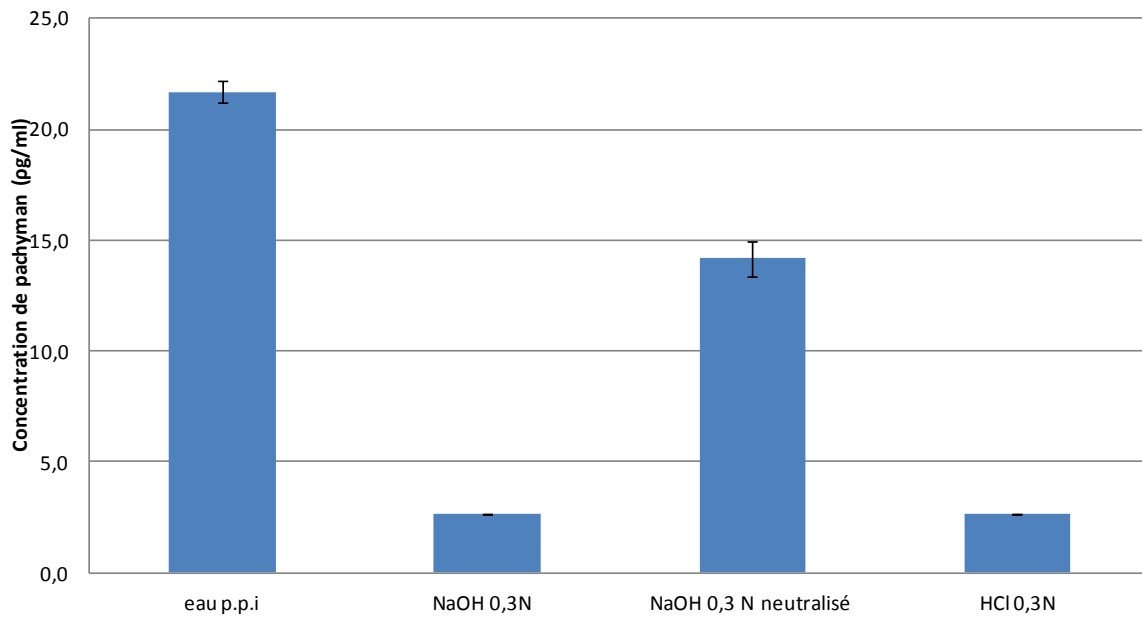


Figure 12 Concentration en pachyman mesurée ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en fonction de la concentration en NaOH ajoutée et de la neutralisation de l'échantillon. La concentration initiale de pachyman est de $25 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les valeurs représentent la moyenne des trois répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

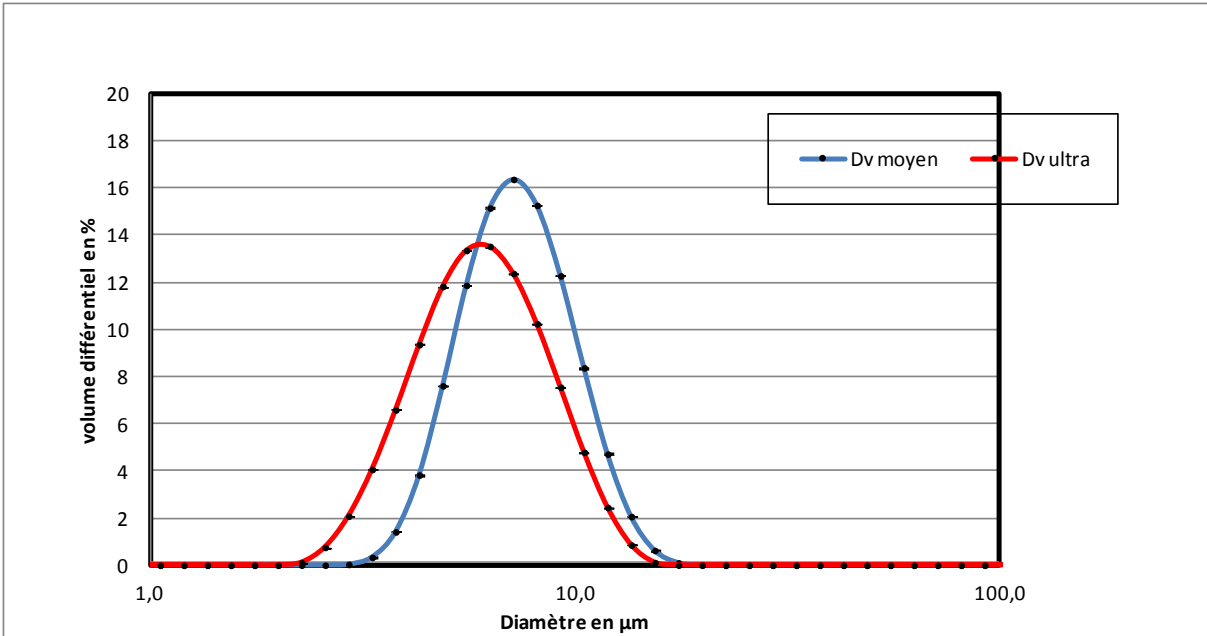


Figure 13 Evolution de la taille de *S.cerevisiae* en fonction des différentes conditions de traitements décrites dans le tableau 4.

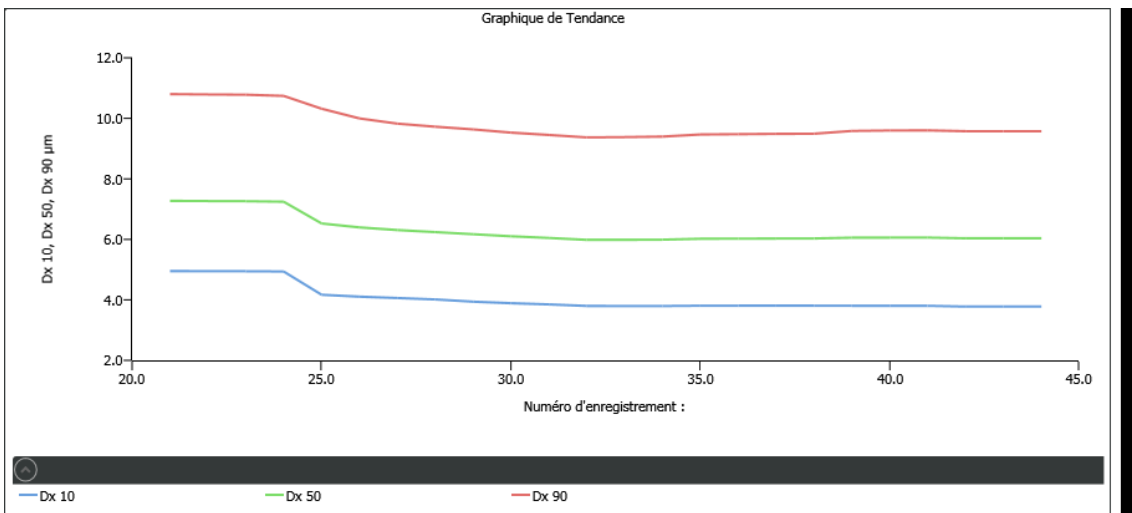


Figure 14 Evolution des Dx10, Dx50 et Dx90 de *S.cerevisiae* en fonction des conditions de traitement décrites dans le tableau 4. La Dx 10 est la valeur de taille pour laquelle 90% des microorganismes ont une taille supérieure (relative aux petits microorganismes). 50% des microorganismes ont une taille supérieure à la Dx50 et 10% des microorganismes ont une taille supérieure à la Dx90 (relative aux gros microorganismes).

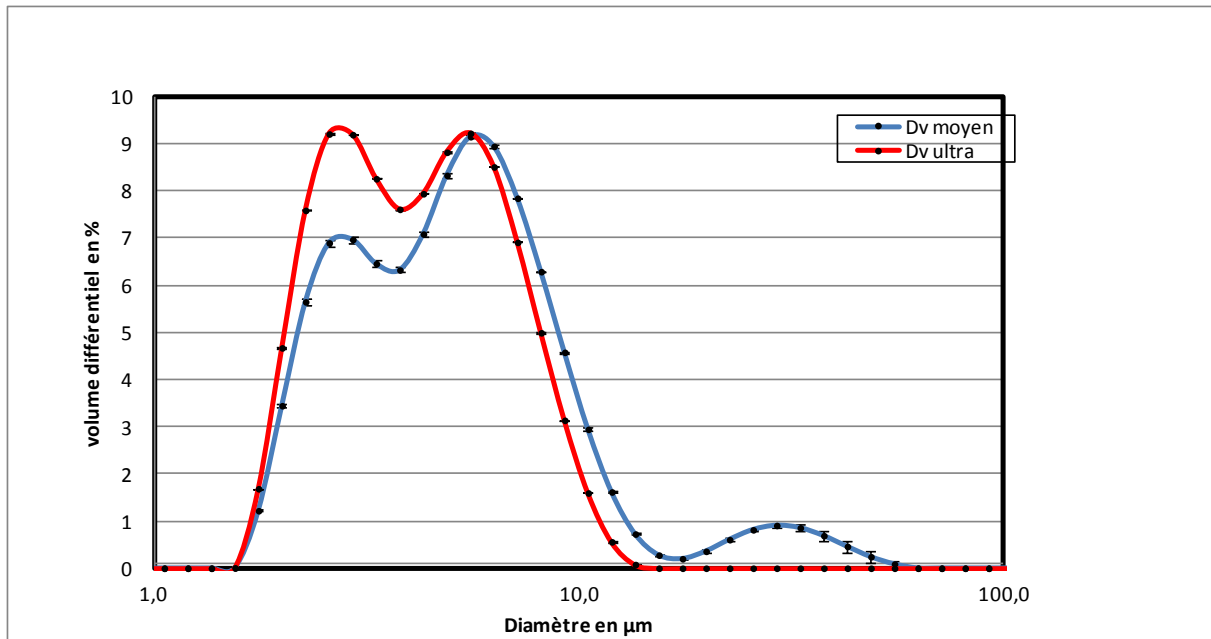


Figure 15 Evolution de la taille de *P.brevicompectum* en fonction des différentes conditions de traitements décrites dans le tableau 5

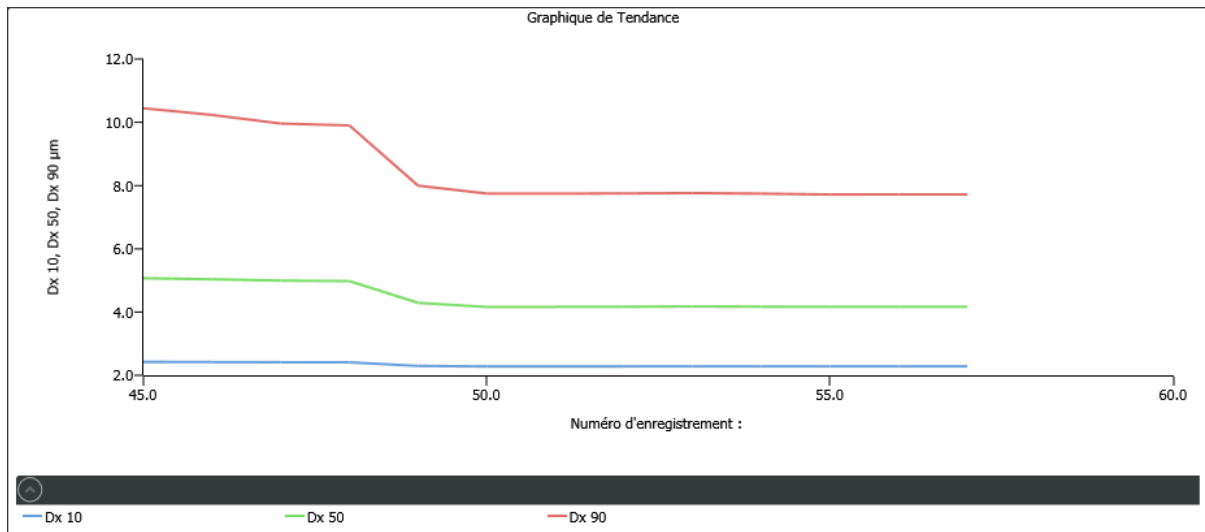


Figure 16 Evolution des Dx10, Dx50 et Dx90 de *P.brevicompectum* en fonction des conditions de traitement décrites dans le tableau 5. La Dx 10 est la valeur de taille pour laquelle 90% des microorganismes ont une taille supérieure (relative aux petits microorganismes). 50% des microorganismes ont une taille supérieure à la Dx50 et 10% des microorganismes ont une taille supérieure à la Dx90 (relative aux gros microorganismes).

Pour la suite de l'essai sur l'influence des prétraitements des (1,3)- β -D-glucanes sur leur dosage par la méthode au LAL, un traitement de 5 min dans le bain à 280 W sera appliqué.

3.3.2 Applications des traitements aux suspensions cellulaires et aux solutions de glucanes

3.3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.2.1.1 Dosage des (1,3)- β -D-glucanes

Pour le facteur de dilution 10^{-4} , la concentration en glucanes est de $3,20 \pm 1$ pg.mL⁻¹ en absence de traitement (figure 17). La variation entre les différentes répétitions est conséquente (31,25%). La sonication n'a pas eu d'effet sur le dosage tandis que le traitement alcalin et le traitement au Tween 80 ont permis une légère augmentation de la concentration en glucanes mesurée (facteur 3,45 et 4,56). La concentration mesurée de (1,3)- β -D-glucanes de *S. cerevisiae* augmente d'un facteur 18,12 après autoclavage et d'un facteur 58,70 après broyage cellulaire. Ce traitement semble être le plus efficace et apparaît comme être le plus répétable avec un coefficient de variation inférieur à 2%.

Pour le facteur de dilution 10^{-5} , une concentration de $1,47 \pm 0,02$ pg.mL⁻¹ est mesurée en absence de traitement (figure 18). Le traitement alcalin et la sonication n'ont pas eu d'effet sur le dosage. La concentration en glucanes dosée augmente d'un facteur 7,22 après broyage cellulaire, d'un facteur 13,25 après autoclavage et d'un facteur 14,95 après traitement au Tween 80. Pour l'ensemble des traitements, la répétabilité est faible variant de 23,45% après broyage à 68,99% après traitement au Tween 80, alors qu'en absence de traitement la variabilité n'est que de 1,68%.

Pour les deux niveaux de dilution, le broyage cellulaire et l'autoclavage ont permis une augmentation significative de la concentration mesurée en (1,3)- β -D-glucanes de levure. En absence de traitement, la concentration en glucanes n'est pas corrélée avec le facteur de dilution. La concentration mesurée à la dilution 10^{-5} ne diminue pas d'un facteur 10 par rapport au niveau de dilution 10^{-4} . Ceci est également le cas pour le traitement au Tween et pour l'autoclavage. La relation entre facteur de dilution et concentration en (1,3)- β -D-glucanes est respectée pour le broyage cellulaire.

Le troisième de niveau de dilution 10^{-6} n'a pas été testé en raison de la faible étendue de la gamme étalon du kit GlucateLL[®].

3.3.2.1.2 Dénombrement des microorganismes cultivables

Les microorganismes cultivables ont été mesurés dans les suspensions cellulaires dans trois des conditions de traitement : sans traitement, broyage cellulaire et sonication. La sonication n'a pas eu

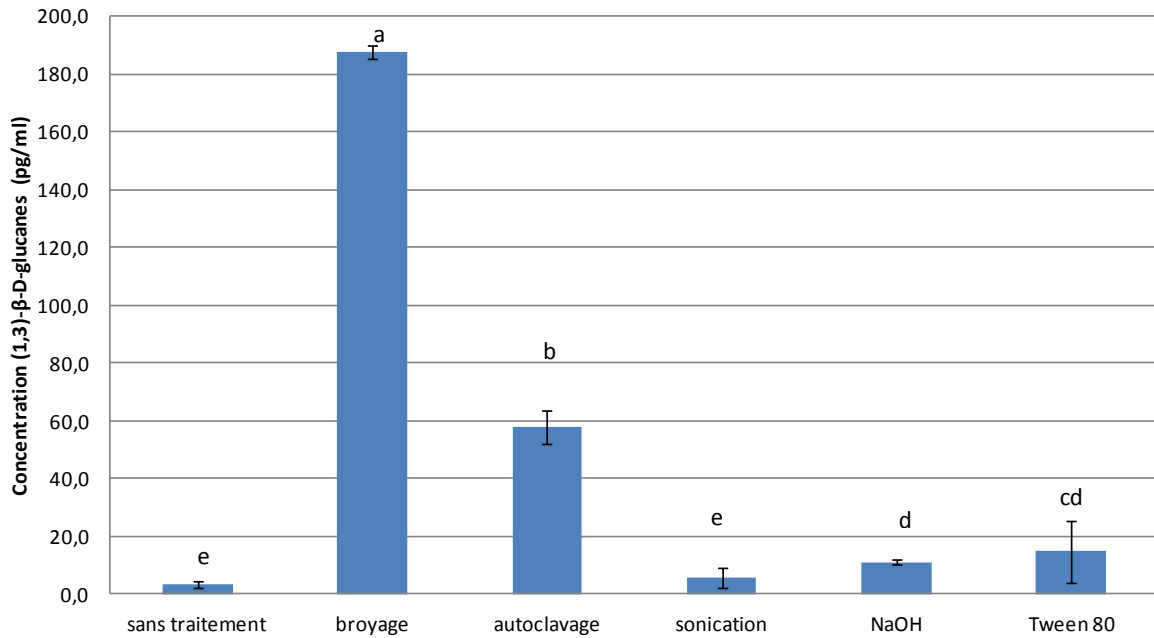


Figure 17 Effet des différents traitements sur le dosage des (1,3)-β-D-glucanes de la suspension de *S. cerevisiae* (dilution 10^{-4}). Les valeurs indiquent la moyenne obtenue pour les 4 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

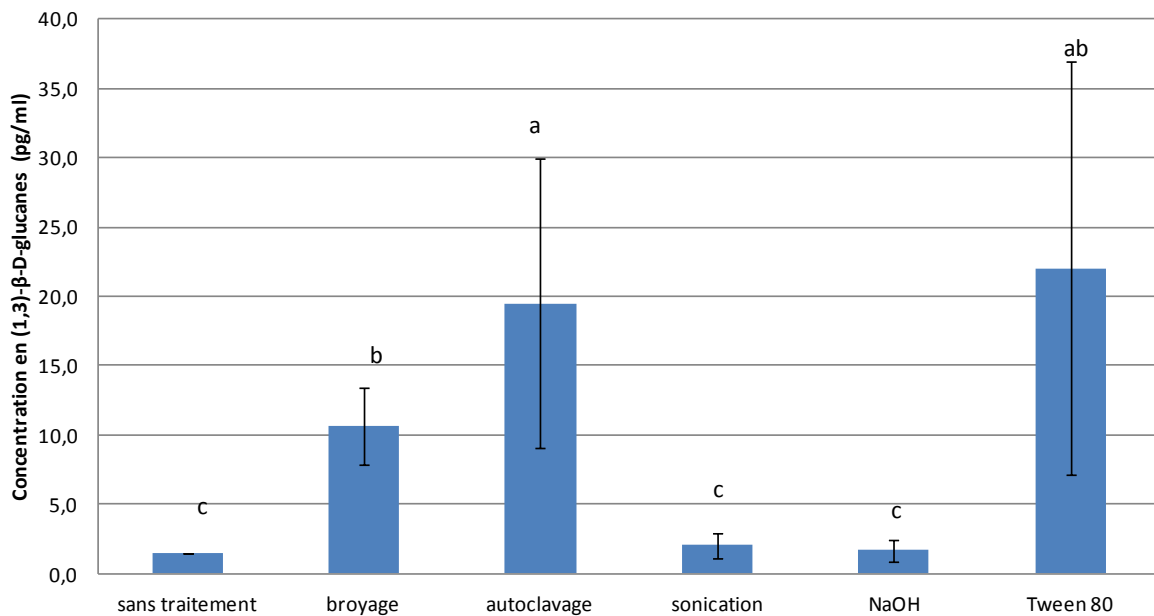


Figure 18 Effet des différents traitements sur le dosage des (1,3)-β-D-glucanes de la suspension de *S. cerevisiae* (dilution 10^{-5}). Les valeurs indiquent la moyenne obtenue pour les 4 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

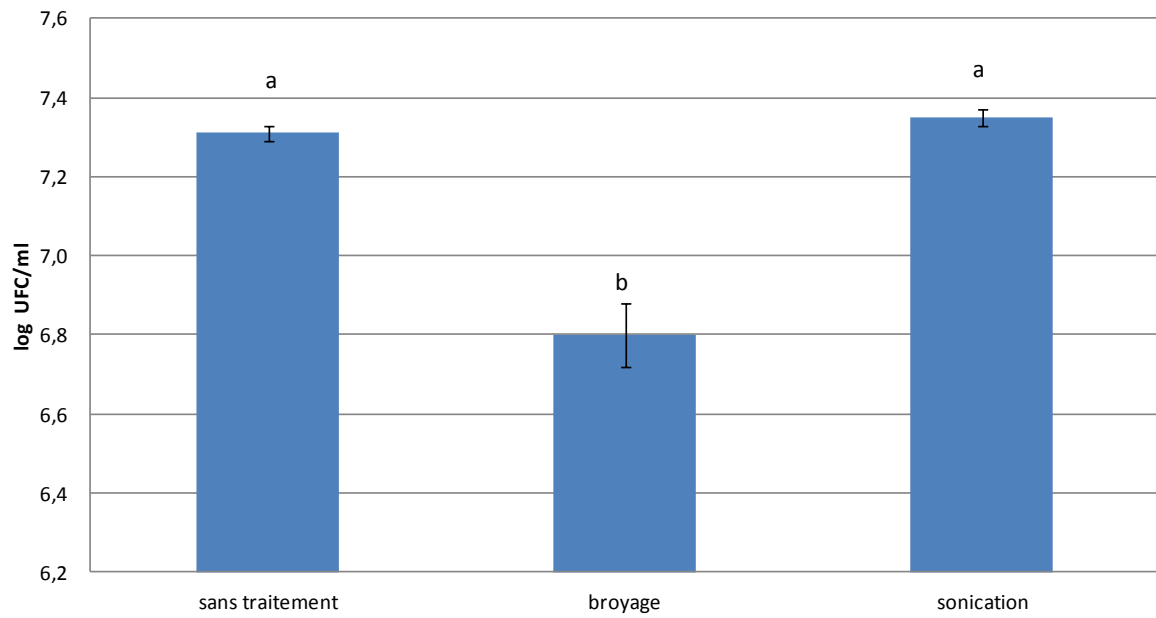


Figure 19 Microorganismes cultivables (log UFC/ml) de la suspension de *S.cerevisiae* mesurée après les différents traitements. Les valeurs correspondent aux moyennes des 4 répétitions et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

d'impact sur les microorganismes cultivables (figure 19). Il y a autant de cellules viables après ultrasons ($7,35 \pm 0,02 \log$ (UFC/mL)) ou sans traitement ($7,31 \pm 0,02 \log$ (UFC/mL)). Le broyage cellulaire provoque une légère diminution des microorganismes cultivables (ANOVA ; $p=0$; $\alpha=0,05$). Cependant, il reste un nombre non négligeable de cellules viables malgré le traitement ($6,80 \pm 0,08 \log$ (UFC/mL)).

3.3.2.2 *Penicillium brevicompactum*

3.3.2.2.1 Dosage des (1,3)- β -D-glucanes

Le deuxième modèle cellulaire est une suspension de spores de *P. brevicompactum*. Pour la dilution 10^{-2} , la concentration en (1,3)- β -D-glucanes de moisissures est de $13,09 \pm 2,18 \text{ pg.mL}^{-1}$ (figure 20). La concentration moyenne de glucanes mesurée est plus faible après traitement aux ultrasons ($9,80 \pm 0,29 \text{ pg.mL}^{-1}$) et après traitement alcalin ($10,00 \pm 0,60 \text{ pg.mL}^{-1}$). L'autoclavage et le traitement au Tween 80 ont eu le même effet, augmentant la concentration mesurée d'environ un facteur 5. Après broyage cellulaire, la concentration dosée est augmentée 50 fois par rapport à l'absence de traitement. Ce traitement a également permis d'augmenter la répétabilité du dosage, le coefficient de variation est de 5,95% après broyage contre 16,65% en absence de traitement. Ceci est également le cas pour le Tween 80 (CV=10,61%).

Pour le deuxième niveau de concentration de 10^{-3} , une concentration de $0,88 \pm 0,18 \text{ pg.mL}^{-1}$ est mesurée en absence de traitement (figure 21). La sonication et le traitement alcalin n'ont pas eu d'effet sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes de moisissures (Mann-Whitney ; $p=0,7$ et $p=0,084$ respectivement ; $\alpha=0,05$). Après traitement au Tween 80, la concentration en glucanes mesurée augmente d'un facteur 2,5. Le broyage cellulaire et l'autoclavage ont le même effet, augmentant la concentration en (1,3)- β -D-glucanes d'un facteur 28 en moyenne. Pour cet essai, la répétabilité du dosage est faible avec des variations allant de 14,53% après broyage à 74,10% après autoclavage. Le broyage cellulaire permet d'augmenter la concentration en glucanes dosés et d'améliorer la répétabilité du dosage.

En absence de traitement, une diminution d'un facteur 10 de la concentration en glucanes est observée entre les deux niveaux de dilution (10^{-2} et 10^{-3}). C'est également le cas pour le broyage cellulaire et le Tween 80. Cette relation est perdue après autoclavage.

Comme pour la levure, le dernier niveau de dilution (10^{-4}) n'a pas été testé en raison de la faible étendue de la gamme étalon du kit GlucateLL.

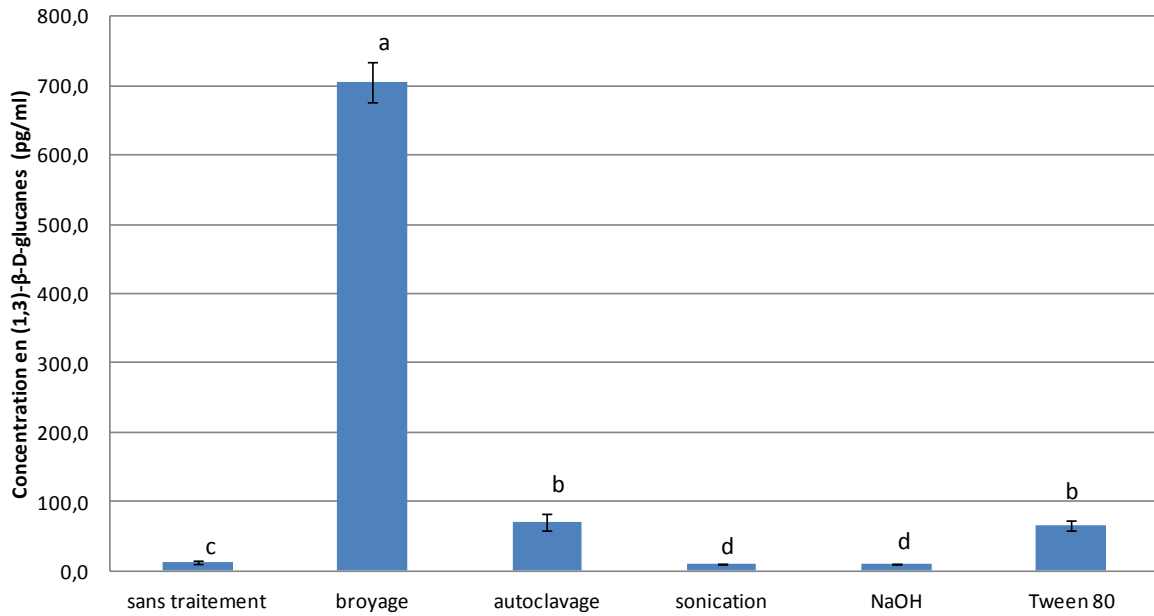


Figure 20 Effet des différents traitements sur le dosage des (1,3)-β-D-glucanes de la suspension de *P. brevicompactum* (dilution 10^{-2}). Les valeurs représentent la moyenne des 4 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

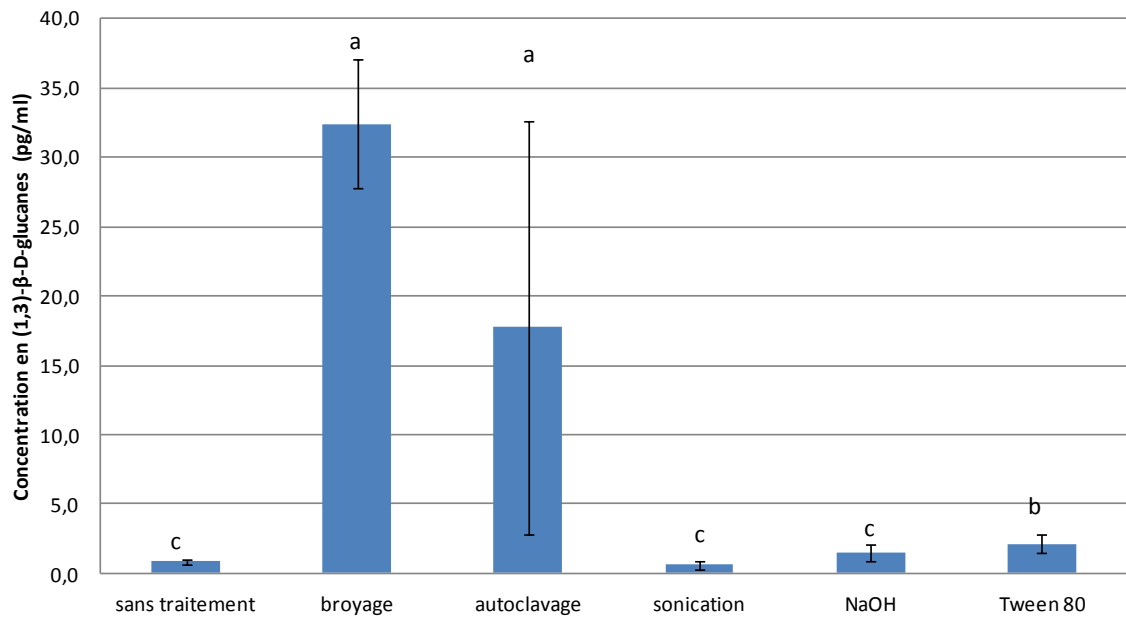


Figure 21 Effet des différents traitements sur le dosage des (1,3)-β-D-glucanes de la suspension de *P. brevicompactum* (dilution 10^{-3}). Les valeurs représentent la moyenne des 4 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

3.3.2.2 Dénombrement des microorganismes cultivables

Le dénombrement de la flore cultivable a été réalisé dans les suspensions après broyage cellulaire, sonication et sur les suspensions non traitées. Le traitement par broyage cellulaire a entraîné une légère diminution des microorganismes cultivables (ANOVA ; $p=0,018$; $\alpha=0,05$) (figure 22). Il reste une quantité importante de spores viables ($6,43 \pm 0,02$ log (UFC/mL)). Il n'y a pas de différence significative entre la flore non traitée et celle traitée par sonication. Après traitement aux ultrasons, la flore cultivable est de $6,5 \pm 0,06$ log (UFC/mL) contre $6,61 \pm 0,1$ log (UFC/mL) en absence de traitement. Il y a une variabilité plus importante en absence de traitement (CV=1,62%) que lorsque les suspensions sont traitées (CV=0,31% après broyage cellulaire).

3.3.2.3 Glucanes de l'orge

Les glucanes de l'orge sont des (1,3)-(1,4)- β -D-glucanes. Lors de la remise en suspension dans l'eau à 55°C, les glucanes forment des agrégats qui restent visibles même après 15 min d'agitation sur l'agitateur orbital. La concentration moyenne dosée pour les solutions non traitées est de $19,01 \pm 1,86$ pg.mL⁻¹ alors que la concentration initiale théorique est de 1000 pg.mL⁻¹ (figure 23). Pour ce modèle, cinq groupes de traitements ont pu être observés. Le traitement alcalin a diminué la concentration en glucanes de l'orge dosés de façon significative (Mann-Whitney ; $p=0,0009$; $\alpha=0,05$). Une diminution de la concentration est également observée après le traitement de broyage cellulaire ($10,55 \pm 1,36$ pg.mL⁻¹). L'autoclavage n'a pas eu d'effet sur la mesure des (1,3)-(1,4)- β -D-glucanes par rapport à l'absence de traitements. La sonication a un effet statistiquement identique à l'autoclavage mais différent par rapport au non traité (Mann-Whitney ; $p=0,33$ et $p=0,023$ respectivement ; $\alpha=0,05$). Le traitement au Tween 80 a permis une augmentation significative de la concentration mesurée d'un facteur 1,5. Il s'agit également du traitement qui a le coefficient de variation le plus faible entre les répétitions (4,41%), il serait donc répétable.

3.3.2.4 Laminarine

La laminarine est un (1,3)-(1,6)- β -glucanes. Elle est composée d'une chaîne linéaire de polymères de glucose relié par une liaison (1,3) et des ramifications en (1,6). Il s'agit d'un petit polymère constitué de 25 à 30 résidus pour un poids moléculaire allant de 3240 à 3860 g.mol⁻¹. Lors de la mise en suspension dans l'eau à 55°C, la solution est limpide sans agrégats visibles. Sans traitement, la concentration en laminarine est de $19,81 \pm 1,86$ pg.mL⁻¹ (figure 24). Comme pour les glucanes de l'orge, les traitements sont répartis en cinq groupes selon leur efficacité même si ces groupes sont

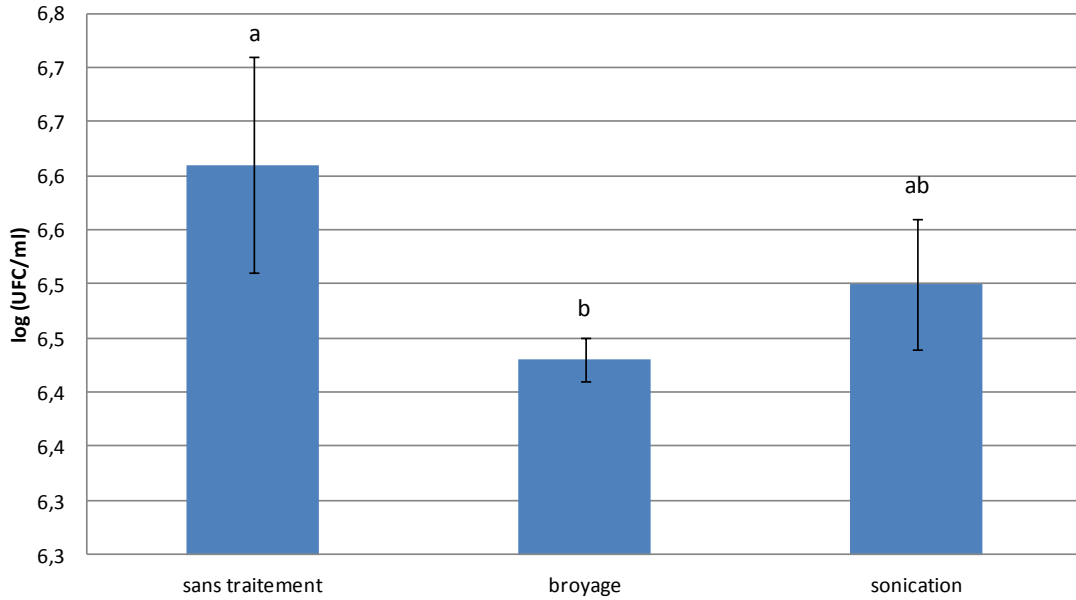


Figure 22 Microorganismes cultivables (log UFC/ml) de la suspension de spores de *P.brevicompactum* mesurée après les différents traitements. Les valeurs correspondent aux moyennes des 4 répétitions et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

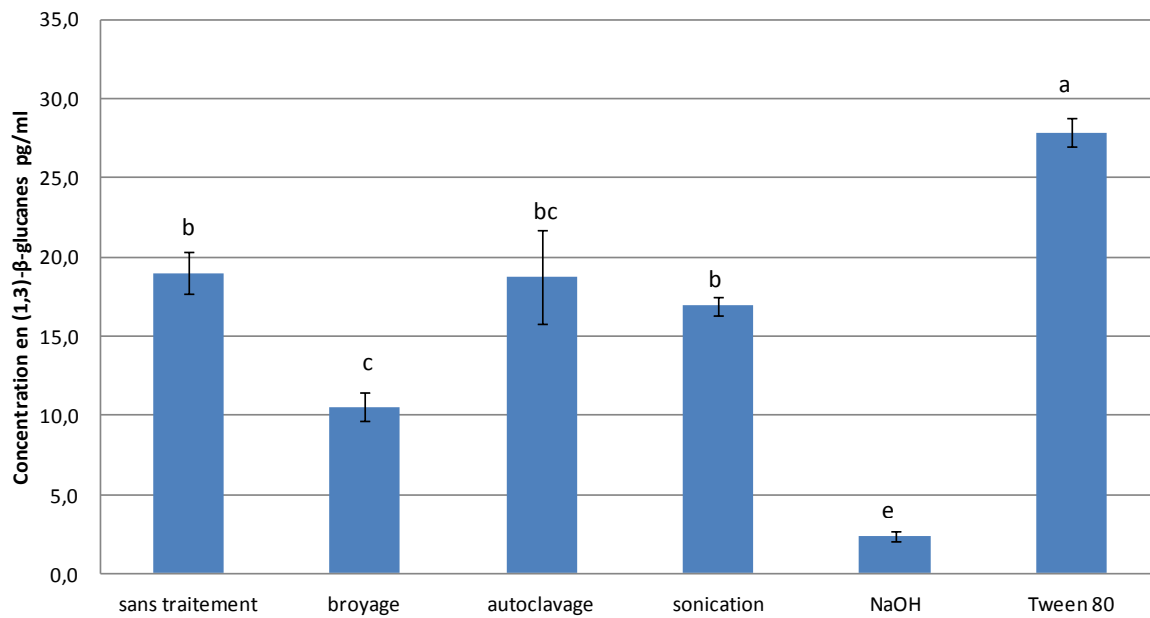


Figure 23 Effet des différents traitements sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes de l'orge (concentration théorique de 1000 pg/mL). Les valeurs représentent les moyennes des différentes répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

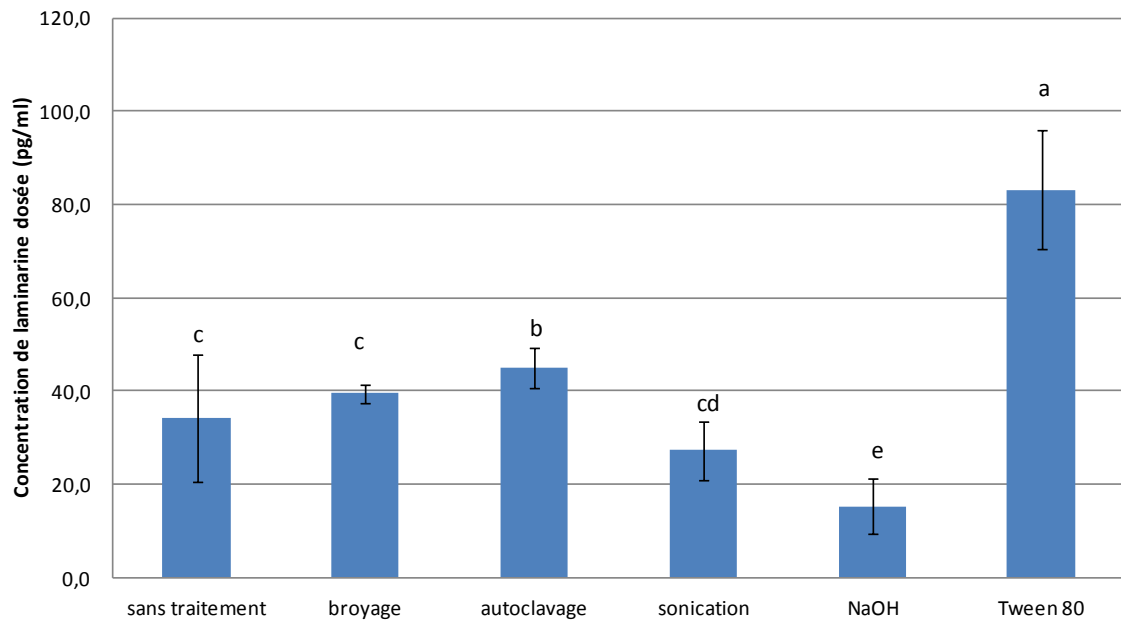


Figure 24 Effet des différents traitements sur le dosage de la laminarine (concentration théorique de 1000 pg/mL). Les valeurs correspondent aux moyennes des différentes répétitions et les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

différents. Sans traitement, la concentration en laminarine mesurée est de $34,22 \pm 13,97 \text{ pg.mL}^{-1}$ avec un coefficient de variation important (40,81%). Comme pour les glucanes de l'orge, le traitement NaOH diminue la concentration en laminarine mesurée à $15,36 \pm 6,2 \text{ pg.mL}^{-1}$. Le broyage cellulaire et la sonication n'ont pas eu d'effet sur le dosage de la laminarine (Mann-Whitney ; $p=0,49$ et $p=0,96$ respectivement ; $\alpha=0,05$). L'autoclavage permet d'augmenter d'un facteur de 1,32 ; la concentration en laminarine dosée (Mann-Whitney ; $p=0,023$; $\alpha=0,05$). Le Tween est le traitement qui semble avoir la meilleure efficacité, il permet d'augmenter la concentration en laminarine mesurée d'un facteur 2,43 par rapport au témoin non traité ($m_{\text{concentration_mesurée}} = 83,14 \pm 13,05 \text{ pg.mL}^{-1}$). Ce traitement améliore également la répétabilité puisque le coefficient de variation diminue à 15,69%.

3.3.2.5 Schizophyllan

Le schizophyllan est un (1,3)-(1,6)- β -D-glucanes tout comme la laminarine mais de poids moléculaire plus important (450 g.mol^{-1}). Lors de la suspension dans l'eau à 55°C , il se forme des agrégats visibles à l'œil nu même après 15 min d'agitation. Sans traitement, la concentration en schizophyllan mesurée est de $0,97 \pm 0,39 \text{ pg.mL}^{-1}$ (figure 25). Les différents traitements sont répartis en 5 groupes homogènes selon leur efficacité. La sonication et le traitement alcalin n'ont pas eu d'effet significatif sur le dosage (Mann-Whitney ; $p=0,13$ et ; $p=0,71$; $\alpha=0,05$). Le traitement au Tween 80 a permis d'augmenter la concentration en schizophyllan d'un facteur 3,76. Le broyage cellulaire a un effet positif sur le dosage du schizophyllan augmentant la concentration mesurée à $9,49 \pm 1,51 \text{ pg.mL}^{-1}$ soit une augmentation d'un facteur 9,79 par rapport aux solutions non traitées. Pour ce modèle, l'autoclavage est le plus efficace, la concentration de schizophyllan dosée est augmentée d'un facteur 18,43 par rapport à l'absence de traitement. Pour ce modèle, la variabilité entre répétitions est importante, le coefficient de variation est compris entre 12,64% pour le traitement alcalin et 43,59% pour le traitement au Tween.

3.3.2.6 Comparaison de la réactivité au LAL des différents glucanes en poudre

Le schizophyllan est le glucane pur en poudre réagissant le moins au dosage en absence de traitement (figure 26). Dans ces conditions, la concentration en schizophyllan mesurée est $0,97 \pm 0,39 \text{ pg.mL}^{-1}$ pour une concentration initiale de $1\ 000 \text{ pg.mL}^{-1}$. Les glucanes de l'orge ont une réactivité intermédiaire, le dosage est plus répétable en absence de traitement pour ce modèle (CV=9,81%). La laminarine semble être le modèle qui a la meilleure réactivité au kit GlucateLL[®] avec une concentration de $34,22 \pm 13,97 \text{ pg.mL}^{-1}$ en absence de traitement. La laminarine est le glucane qui est apparu comme le plus soluble dans l'eau à 55°C . En absence de traitement, les différents modèles glucanes réagissent différemment au LAL.

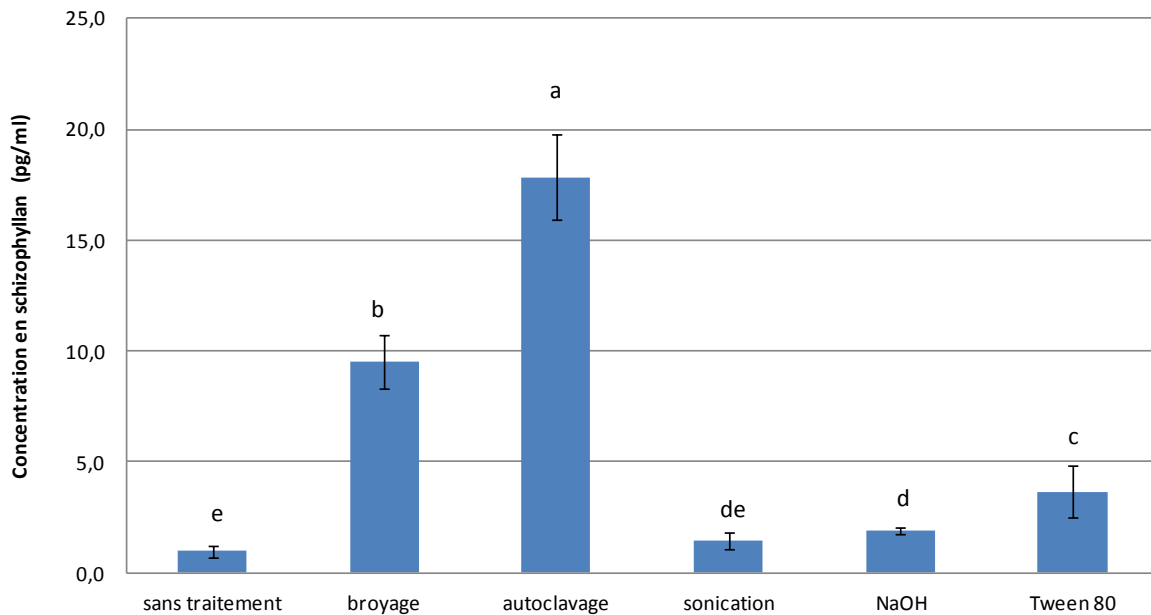


Figure 25 Effet des différents traitements sur le dosage du schizophyllan (concentration théorique de 1000 pg/mL). Les valeurs correspondent aux moyennes des différentes répétitions et les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance 95%. Les lettres représentent les groupes homogènes ($\alpha=0,05$).

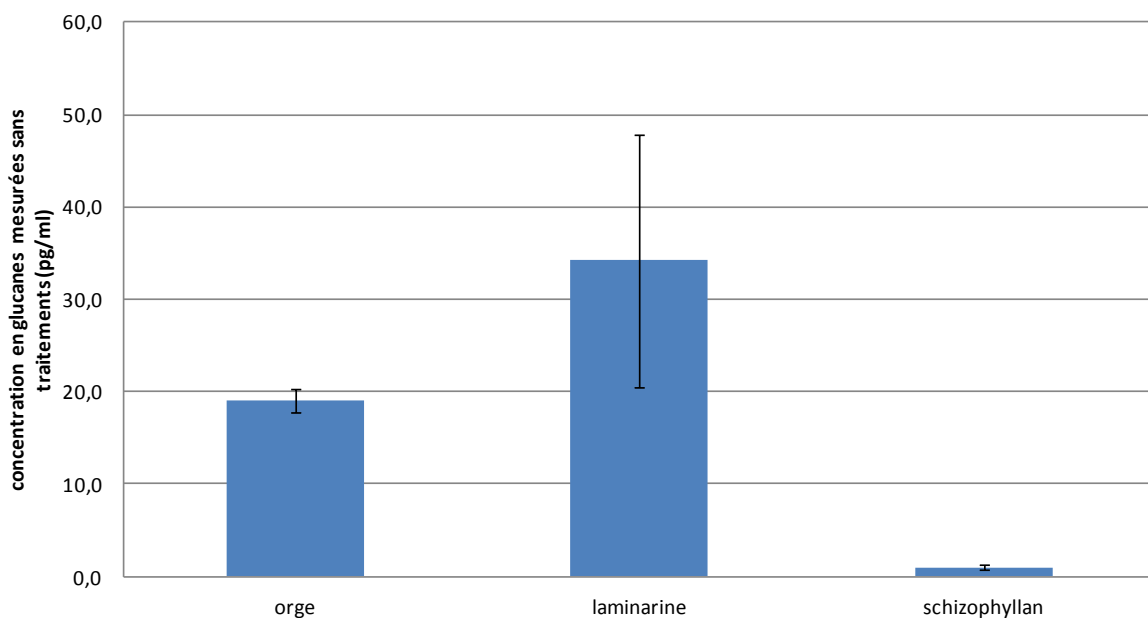


Figure 26 Concentrations en (1,3)- β -D-glucanes mesurées dans les solutions non traitées préparées à partir des différents modèles de glucanes purs en poudre. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

3.3.3 Influence du pH du liquide de mise en suspension des (1,3)- β -D-glucanes sur leur dosage par le LAL

Un dosage de glucanes a été réalisé dans l'eau p.p.i et le tampon PBS en l'absence de traitement, après broyage cellulaire et après broyage cellulaire combiné au traitement au Tween 80. Pour toutes les répétitions effectuées dans l'eau p.p.i, il n'y a pas de (1,3)- β -D-glucanes dosés. La décontamination par sonication des flacons contaminés pendant 2h dans de l'éthanol a permis de diminuer la concentration en (1,3)- β -D-glucanes en dessous de la limite de détection (figure 27).

En revanche, pour les répétitions réalisées dans du tampon PBS, des concentrations de glucanes de $4,85 \pm 0,43$ pg.mL⁻¹ en absence de traitement ; $2,94 \pm 1,22$ pg.mL⁻¹ après le broyage seul ; $14,03 \pm 0,78$ pg.mL⁻¹ après broyage suivi d'un traitement au Tween sont mesurées. Le tampon PBS est donc contaminé en (1,3)- β -D-glucanes. Si les essais sur l'influence du pH sur le dosage au LAL démontrent qu'il faut utiliser le tampon PBS, celui-ci devra être décontaminé au préalable.

La mesure du pH dans les deux liquides de mise en suspension montre une différence de pH entre l'eau p.p.i et le tampon PBS (figure 28). En effet, l'eau p.p.i est acide (pH= $5,0 \pm 0,3$) tandis que le tampon PBS est neutre (pH= $7,1 \pm 0,3$). Le pH de chaque solution reste stable après traitement. L'utilisation de ces deux liquides est judicieuse pour étudier l'influence éventuelle du pH sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL.

3.3.3.1 *S. cerevisiae*

Dans l'eau p.p.i, la concentration de glucanes mesurée en absence de traitement est de $1,97 \pm 0,38$ pg.mL⁻¹ (figure 29). Cette concentration est augmentée d'un facteur 80 après broyage cellulaire et d'un facteur supérieur à 115 après broyage cellulaire suivi d'un traitement au Tween 80 ($233,89 \pm 10,75$ pg.mL⁻¹). La répétabilité du dosage est améliorée après traitement des suspensions. Le coefficient de variation diminue de 19,31% sans traitement à 4,60% après broyage cellulaire suivi d'un traitement au Tween 80.

Dans le tampon PBS, la concentration en glucanes dosée est de $3,16 \pm 0,38$ pg.mL⁻¹ lorsque la suspension n'est pas traitée. Après broyage cellulaire, une augmentation de la concentration mesurée d'un facteur 11 est observée. Cette augmentation est maximum après le broyage cellulaire suivi du traitement au Tween (facteur 47). Les coefficients de variation sont plus importants que dans l'eau, ils sont d'environ 13%. Le pH des suspensions dans de l'eau est de $4,7 \pm 0,3$ et celui des suspensions dans le tampon PBS est de $7,1 \pm 0,3$ (figure 30). Il ne varie pas selon les traitements.

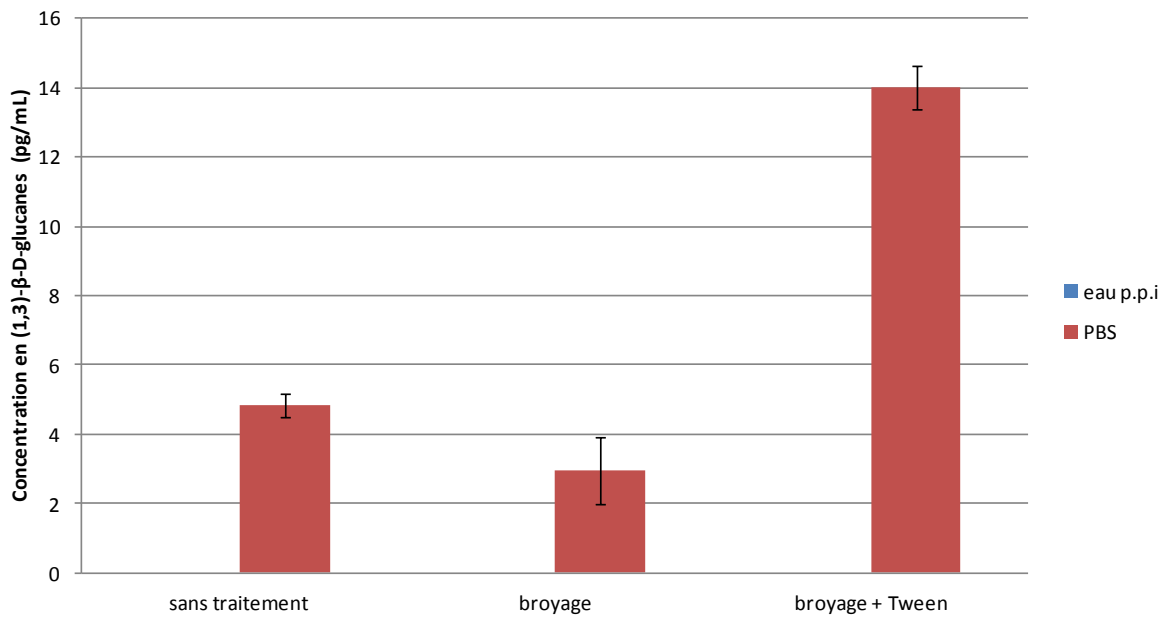


Figure 27 Concentration en (1,3)-β-D-glucanes résiduels mesurée ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) après traitement dans les billes de lyse décontaminées par sonication 2h dans l'éthanol et dans les liquides de solubilisation. Les valeurs correspondent à la moyenne des 3 répétitions et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%.

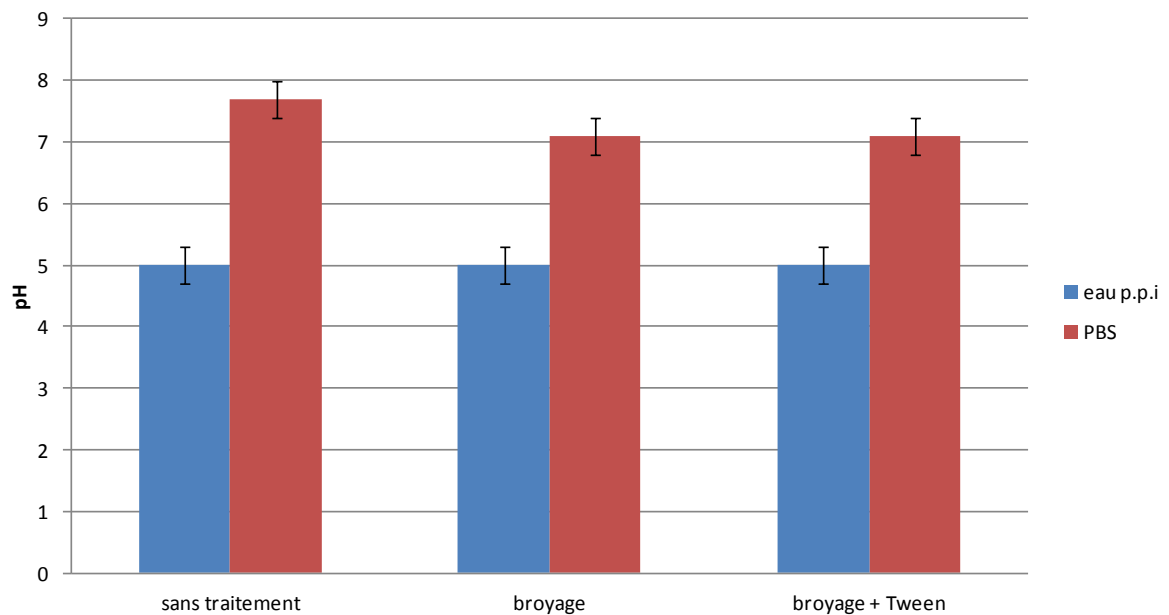


Figure 28 pH mesuré dans les solutions après traitement. Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

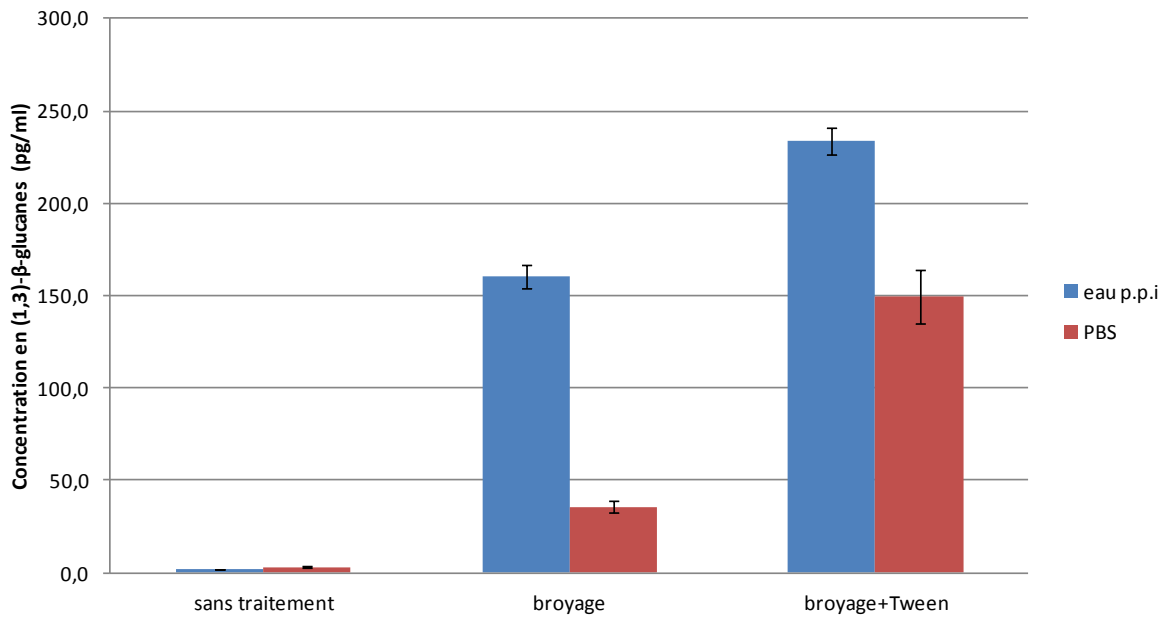


Figure 29 Effet des différents traitements et du pH sur le dosage des (1,3)-β-D-glucanes de la suspension de *S. cerevisiae* (dilution 10^{-4}). Les valeurs indiquent la moyenne obtenue pour les 4 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

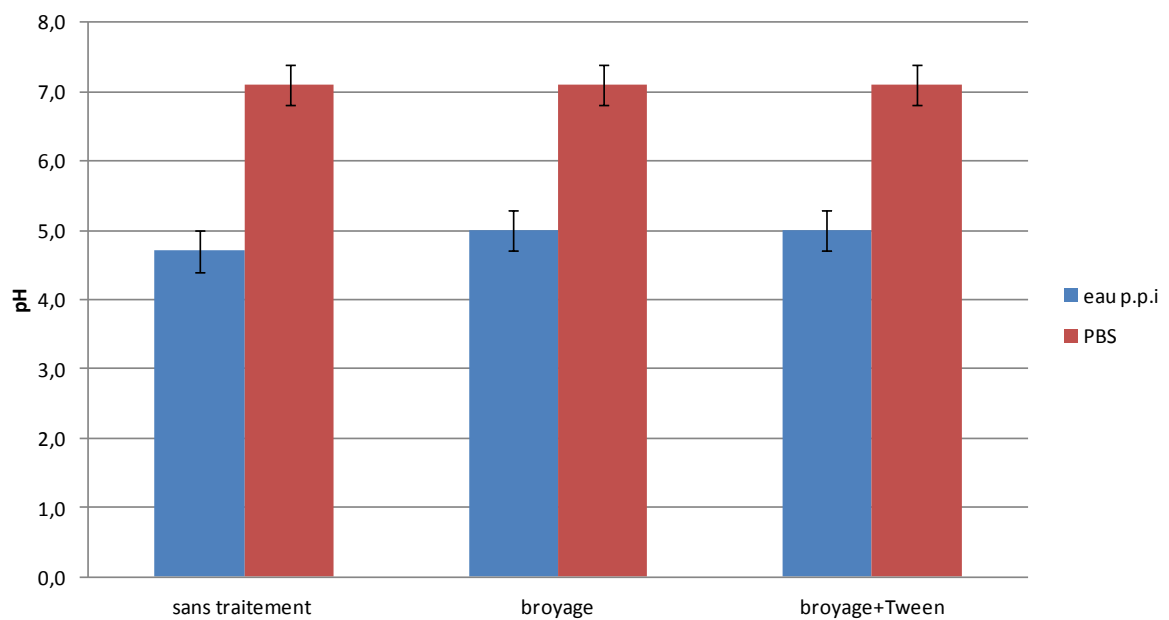


Figure 30 pH mesuré dans les suspensions de *S. cerevisiae* (dilution 10^{-4}) après traitement. Les valeurs indiquent la moyenne obtenue pour les 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

Au vue des ces résultats, le dosage des (1,3)- β -D-glucanes est maximum lorsque la mise en suspension des levures se fait dans de l'eau p.p.i et lorsque la suspension a été traitée par broyage cellulaire suivi d'un traitement au Tween 80.

3.3.3.2 *Laminarine*

Dans cet essai, la laminarine pure en poudre a été dosée en absence de traitement après mise en solution dans de l'eau p.p.i ou dans du tampon PBS.

Dans l'eau p.p.i, la concentration en laminarine mesurée est de $44,80 \pm 6,04 \text{ pg.mL}^{-1}$ (figure 31). Dans le tampon PBS, cette concentration est de $40,25 \pm 6,09 \text{ pg.mL}^{-1}$.

Le choix de la solution de solubilisation de la laminarine ne semble pas avoir d'influence sur le dosage de la laminarine par le kit GlucateLL (Mann-Whitney : $p=0,19$; $\alpha=0,05$). La répétabilité n'est pas non plus affectée par l'utilisation de l'une ou l'autre solution. Le coefficient de variation est de 13,47% pour le dosage dans l'eau p.p.i et de 15,12% dans le tampon PBS.

Le pH est constant, il est de $4,7 \pm 0,3$ pour la solution dans l'eau p.p.i et de $7,1 \pm 0,3$ dans le tampon.

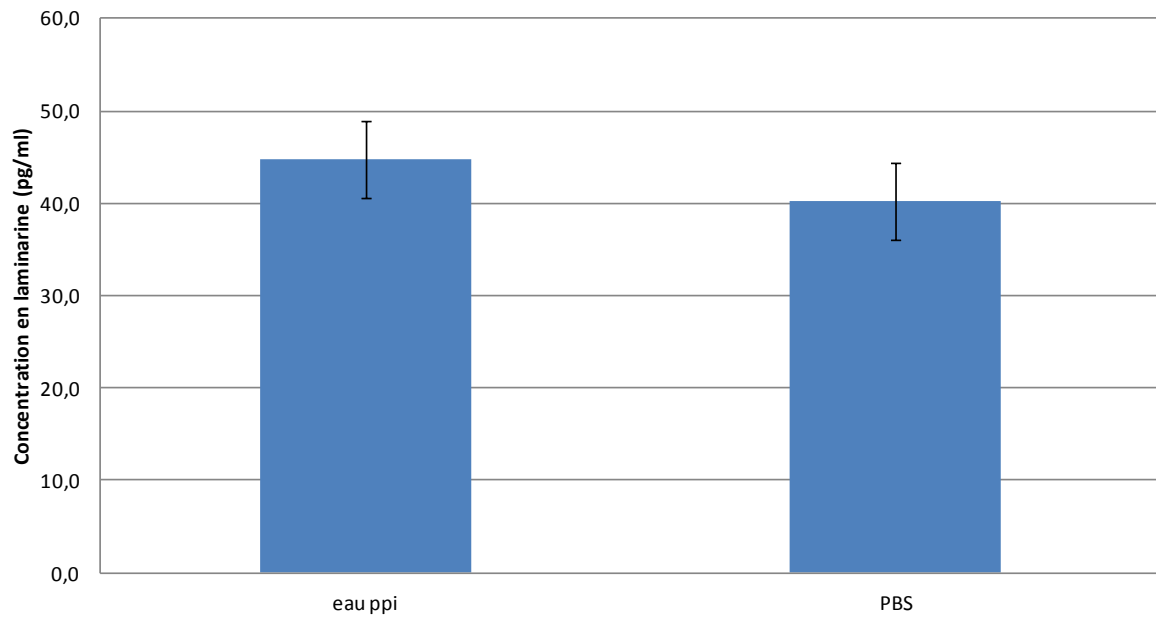


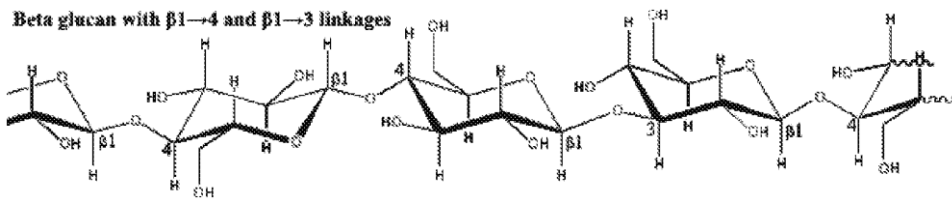
Figure 31 Concentration en laminarine mesurée (pg.mL^{-1}) sans traitement, solubilisée dans de l'eau p.p.i ou dans du tampon PBS. Les valeurs indiquent la moyenne obtenue pour les 4 répétitions et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance 95%.

4 Discussion

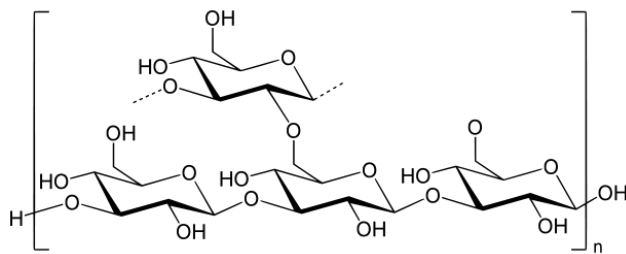
Les (1,3)- β -D-glucanes sont des polymères de glucose présents chez les champignons, chez les plantes et certaines bactéries entre autres. Ce sont des composés qui sont pour la plupart insolubles dans l'eau (Laroche and Michaud, 2007; Seo *et al.*, 2007). Les essais de dosage des (1,3)- β -D-glucanes (dans une suspension de *S. cerevisiae*) ont mis en évidence que la concentration moyenne en glucanes mesurée était de $7,91 \pm 0,47 \text{ pg.mL}^{-1}$ quelque soit la dilution. Pour *P. brevicompactum*, les mesures de concentration en glucanes pour les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} sont statistiquement identiques (concentration moyenne de $4,43 \pm 0,70 \text{ pg.mL}^{-1}$). Sans traitement, lorsque la concentration initiale de la suspension cellulaire (*S. cerevisiae* et *P. brevicompactum*) diminue, la concentration en (1,3)- β -D-glucanes mesurée ne diminue pas de la même manière. En absence de traitement, la concentration mesurée des glucanes en poudre varient selon les modèles alors que la concentration initiale est la même (1000 pg.mL^{-1}). Le réactif Glucatell[®] réagit le mieux à la laminarine avec une concentration mesurée de $19,81 \pm 1,86 \text{ pg.mL}^{-1}$. Le schizophyllan, quant à lui, est très peu dosé grâce avec la méthode au LAL avec une concentration mesurée de $0,97 \pm 0,39 \text{ pg.mL}^{-1}$. La laminarine était apparue comme la plus soluble dans l'eau à 55°C comparée aux autres modèles. La solubilité des glucanes dans l'eau est différente selon le glucane considéré. La nécessité de traiter les suspensions et solutions de (1,3)- β -D-glucanes avant leur dosage s'impose.

Lors de l'étude, cinq protocoles de traitement ont été testés en comparaison avec des témoins non traités. Il s'est avéré qu'il y a une réelle influence des traitements sur le dosage des glucanes par le kit Glucatell[®]. Le broyage cellulaire semble être un des plus efficaces dans les conditions de notre étude. En effet, ce traitement peut augmenter jusqu'à plus de 50 fois la concentration en glucanes mesurée par le kit Glucatell[®] dans les suspensions cellulaires (58,7 fois pour la suspension de *S. cerevisiae* à la dilution 10^{-4} ; 53,96 fois pour la suspension de *P. brevicompactum* à la dilution 10^{-2}). Il est probable que le traitement altère l'intégrité de la paroi et libère les (1,3)- β -D-glucanes. Ceci est conforté par la diminution du nombre de microorganismes cultivables après ce traitement. Il reste cependant un grand nombre de cellules viables ce qui entraîne probablement une sous-estimation de la concentration en (1,3)- β -glucanes présents dans la suspension. Pour les glucanes purs en poudre, le broyage a diminué la concentration moyenne mesurée en glucanes d'un facteur 1,82 par rapport à l'absence de traitement. Ce traitement a un effet négatif sur le dosage des glucanes de l'orge. Les glucanes provenant de l'orge sont des (1,3)-(1,4)- β -D-glucanes (figure 32), il est possible que le traitement favorise la rupture des liaisons (1,3) diminuant ainsi les sites de reconnaissance du réactif LAL. Ce traitement a des effets différents pour un même type de glucanes. En effet, le broyage n'a pas d'influence sur le dosage de la laminarine

A



B



C

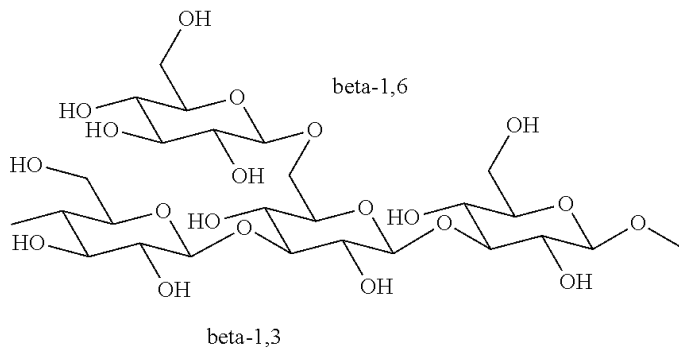


Figure 32 A. : Structure moléculaire des glucanes de l'orge, polymères de glucoses liés par des liaisons (1,3) et (1,4) (disponible en ligne : <http://www.google.com/patents/WO2010127912A1?cl=en>). B : Structure moléculaire de la laminarine, polymère de glucoses liés par des liaisons (1,3) ramifié en (1,6) (masse moléculaire : $3240\text{-}3860 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). C : Structure moléculaire du schizophyllan, polymère de glucoses liés par des liaisons (1,3) ramifié en (1,6) (masse moléculaire : $450\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (disponible en ligne : <http://www.google.com/patents/US20120270033>).

(Mann-Whitney ; $p=0,49$; $\alpha=0,05$). En revanche la concentration en schizophyllan mesurée par le kit GlucateLL[®] est augmentée d'un facteur 10 après ce traitement. Ces deux glucanes sont des (1,3)-(1,6)- β -glucanes (figure 32) mais les molécules sont de poids moléculaires différents. La laminarine est un glucane de faible poids moléculaire, (environ 3240 à 3860 g.mol^{-1}) tandis que le schizophyllan a un poids moléculaire plus important (environ $450.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$) (données fournisseur). L'hypothèse est que la laminarine n'a pas une taille suffisamment importante pour être affectée. L'augmentation de la réactivité au LAL peut être expliquée par des cassures au niveau des ramifications en (1,6), diminuant ainsi l'encombrement stérique et favorisant l'accès au réactif LAL. Cette hypothèse est confortée par Iossifa *et al* (2008) qui démontre que le degré de ramification aurait un impact sur la réactivité au LAL des (1,3)- β -D-glucanes : plus il est important, plus la réactivité est importante. Il y a, malgré tout, des exceptions d'après ces auteurs, le schizophyllan a une masse moléculaire importante et pourtant il réagit peu au LAL (dans notre essai : $0,97 \pm 0,39 \text{ pg.mL}^{-1}$ sans traitement). La réactivité au LAL des (1,3)- β -D serait fonction de leur solubilité, leur structure tridimensionnelle mais également de leur taille. Il semblerait que la concentration minimum en (1,3)- β -D-glucanes permettant d'activer la réaction du dosage augmente avec la masse moléculaire de ces polymères. Ainsi, d'après Tanaka *et al* (1991), une masse moléculaire de 6800 g.mol^{-1} (curdlan partiellement dégradé) serait un minimum pour permettre l'activation du facteur G pour une solution diluée à 10^{-8} .

Le deuxième traitement permettant d'améliorer la réactivité au LAL, est le traitement au Tween 80. Il a permis d'augmenter la concentration moyenne en (1,3)- β -D-glucanes mesurée pour tous les modèles, d'un facteur 1,47 au minimum (glucanes de l'orge) à un facteur maximum de 15 (*S. cerevisiae* à la dilution 10^{-5}). Le Tween 80 est un détergent, donc une molécule amphiphile. Grâce à cette propriété, il est envisageable que le Tween 80 améliore la solubilité des (1,3)- β -D-glucanes. Toutefois, des grandes variabilités ont été observées entre les répétitions pour la plupart des modèles avec des coefficients de variation pouvant s'élever à 75% (*S. cerevisiae* à la dilution 10^{-4}). La répétabilité peut être améliorée, pour le dosage des glucanes de l'orge, le coefficient de variation diminue à 4,5%. Le manque de répétabilité est probablement dû à la viscosité du Tween 80 qui rend difficile son pipetage. Le traitement doit encore être perfectionné pour améliorer la répétabilité. Le Tween 80 est très souvent utilisé lors des études de terrains pour extraire les (1,3)- β -D-glucanes des filtres dans les cassettes même si les conditions d'utilisation ne sont pas standardisées (Seo *et al.*, 2007; Reponen *et al.*, 2010). Le Tween semble être un bon moyen de solubiliser les (1,3)- β -D-glucanes, quelque soit leur taille ou leur structure.

Ces résultats ont conduit à mener un essai complémentaire. Un traitement par broyage cellulaire est suivi d'un traitement au Tween 80. Ce traitement a été testé sur une suspension de *S. cerevisiae* à la dilution 10^{-4} . Après broyage cellulaire seul, la concentration en glucanes mesurée est de $160,04 \pm 9,12 \text{ pg.mL}^{-1}$. Cette concentration moyenne augmente à $233,89 \pm 10,75 \text{ pg.mL}^{-1}$ lorsque la suspension est

traitée par broyage cellulaire et par traitement au Tween. Le broyage cellulaire permettrait la lyse des cellules et le Tween augmenterait la solubilité des (1,3)- β -D-glucanes de la fraction insoluble.

Après traitement par autoclavage, les concentrations en glucanes mesurées dans les suspensions cellulaires ont été augmentées entre 5 fois (*P. brevicompactum* à la dilution 10^{-2}) et 20 fois (*P. brevicompactum* à la dilution 10^{-3}). L'autoclavage a eu une influence positive sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes présents dans les suspensions cellulaires. Comme pour le broyage, l'hypothèse est que ce traitement thermique altère les cellules libérant les (1,3)- β -D-glucanes, les rendant accessibles au réactif LAL. Ce traitement n'a pas d'effet pour les glucanes purs en poudre hormis pour le schizophyllan. La concentration mesurée en schizophyllan a été augmentée 18 fois après autoclavage par rapport à l'absence de traitement. Si l'autoclavage est un traitement utilisé lorsque les (1,3)- β -D-glucanes sont dosés par la méthode EIA mise au point par Douwes *et al* (1995), son utilisation pour le dosage des glucanes par la méthode au LAL n'est pas mentionnée dans la littérature.

Cependant, les flacons utilisés pour le traitement thermique restent contaminés en glucanes (concentration moyenne de $10,2 \pm 3,46$ pg.mL⁻¹) malgré la procédure de décontamination. Il n'est pas possible de quantifier précisément les glucanes présents dans l'échantillon traité, ni d'évaluer l'influence du traitement par rapport au témoin non traités. Malgré tout, la concentration en glucanes mesurée dans le matériel contaminé est négligeable par rapport à celles mesurées dans tous les modèles traités. L'autoclavage permet positive d'augmenter la quantité de (1,3)- β -D-glucanes dosés même s'il n'est pas possible de déterminer précisément la quantité de (1,3)- β -D-glucanes présente dans les suspensions et solutions modèles.

Ceci démontre l'importance et la difficulté de la décontamination du matériel de prélèvement lors des mesures sur les bioaérosols. En effet, parmi toutes les stratégies de décontamination envisagées, une seule s'est révélée efficace : la décontamination par ultrasons pendant 2h dans de l'éthanol comme décrit par Shogren et Park (2011). Les (1,3)- β -D-glucanes sont généralement présents en faible quantité dans l'air allant d'une dizaine à une centaine de ng.m⁻³ selon les études (tableau 2). La contamination du matériel peut entraîner des biais dans la mesure des glucanes (quantité de glucanes dosés, répétabilité et reproductibilité des mesures...), entraînant une surestimation des expositions.

Deux traitements n'ont pas été efficaces. Le premier est la sonication. Aucun des modèles testés, suspension cellulaire ou glucanes purs en poudres, n'a vu une réactivité au LAL de ses (1,3)- β -D-glucanes augmenter. La mesure des microorganismes cultivables a montré qu'il n'y a pas de différence entre les suspensions traitées par sonication (*S. cerevisiae* : $7,35 \pm 0,02$ log UFC.mL⁻¹ ; *P. brevicompactum* : $6,5 \pm 0,06$ log UFC.mL⁻¹) et celles qui ne l'ont pas été (*S. cerevisiae* : $7,31 \pm 0,02$ log UFC.mL⁻¹ ; *P. brevicompactum* : $6,61 \pm 0,1$ log UFC.mL⁻¹). Dans les conditions de traitement choisies, les ultrasons n'auraient pas d'effet sur les cellules, ne les lysaient ni même ne les

endommageraient. La quantité de glucanes accessibles au réactif LAL serait la même avec ou sans sonication.

Le traitement alcalin apparaissait comme l'un des traitements les plus prometteurs et très utilisé dans la littérature. Cependant, dans notre étude, ce traitement n'a permis d'augmenter que très légèrement la réactivité des glucanes au LAL de la suspension de *S. cerevisiae* (dilution 10^{-4}). Pour les autres modèles, le traitement alcalin n'a pas augmenté la concentration en (1,3)- β -D-glucanes mesurée. Elle a même diminuée d'un facteur 2 pour la laminarine et d'un facteur 8 pour les glucanes de l'orge. Les mesures du pH des solutions et suspensions traitées ont montré que le pH est d'environ 4-4,4 alors qu'un pH de 7 était attendu. Le dosage par la méthode au LAL est un dosage enzymatique, sensible au pH. Le pH préconisé par le fournisseur est de 7,4 (tampon de mise en solution du réactif GlucateLL[®]). Il est probable qu'un pH acide inhibe la réaction enzymatique. En effet, le site de reconnaissance, entre le facteur G et la liaison β -(1,3) des glucanes, est constitué par les résidus Asp₁₅₀-Glu₁₅₁ de la sous unités alpha du facteur G (Young and Castranova, 2005). Une variation importante du pH pourrait modifier le site de reconnaissance des glucanes et ne pas activer le facteur G. De plus, *Roslansky et Novitsky*, dans leur étude sur l'influence du pH sur la sensibilité du réactif LAL (Roslansky and Novitsky, 1991), préconisent un pH compris entre 6,4 et 8 pour avoir une réaction optimisée. Pour vérifier la validité de ces hypothèses, des essais complémentaires ont été menés afin de déterminer l'influence du pH sur le dosage au LAL et le cas échéant revoir le mode opératoire du traitement alcalin. Après mesure du pH dans tous les échantillons, le pH de l'eau p.p.i est de $5,0 \pm 0,3$ et donc acide. Le pH du tampon PBS, quant à lui, est de 7,6 soit dans la gamme de pH préconisée par Roslansky dans son étude sur l'influence du pH sur la sensibilité du réactif LAL (Roslansky and Novitsky, 1991). Pourtant, le dosage des (1,3)- β -D-glucanes de *S. cerevisiae* est plus efficace lorsqu'il est réalisé dans de l'eau p.p.i que dans du tampon PBS alors que celui de la laminarine n'est pas influencé par le liquide de solubilisation (Mann-Whitney : $p=0,19$; $\alpha=0,05$). Le tampon PBS n'a pas d'effet positif sur le dosage en dépit de son pH neutre. Il semblerait que le pH ne soit pas le seul paramètre qui influe sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL dans notre étude. Il est également possible que les effets bénéfiques du traitement alcalin (conversion des triples hélices de glucanes en simples hélices) soient supprimés par l'ajout de l'HCl. Une autre explication serait la brièveté du traitement alcalin. En effet, la durée du traitement peut dépasser 1 heure, il est d'au minimum 2,5 heure d'après *Foto et al* (2004) pour augmenter la réactivité du curdlan au réactif LAL (Foto *et al.*, 2004). D'après ces auteurs, le traitement alcalin serait efficace pour les glucanes linéaires comme le curdlan mais ne le serait pas pour ceux contenant des liaisons (1,2) ;(1,4) ou (1,6). Par ailleurs, si le traitement alcalin est présenté comme efficace par certains auteurs (Saitô *et al.*, 1991), d'autres ont publiés des résultats contradictoires. Selon Roslansky et Novitsky 1991), la laminarine perd 25% de sa réactivité au LAL lorsqu'elle est traitée avec une solution de NaOH à 0,1 N pendant

4h à 37°C (Roslansky and Novitsky, 1991). Face à ces constatations, il est probable que le pH et le traitement alcalin aient un effet sur le réactif LAL. Par ailleurs, un autre kit de dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL, le kit Fungitell[®] préconisent un traitement au KOH dans leur procédure d'utilisation du kit. Au vue de ces informations contradictoires, nous ne pouvons conclure sur l'influence du traitement alcalin sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par le réactif GlucateLL[®], dans les conditions de l'étude. Il faudrait revoir le mode opératoire du traitement en modifiant la concentration de la solution NaOH, la durée de traitement ainsi que la neutralisation. Pour approfondir le sujet et pour améliorer la maîtrise de ce traitement, des essais complémentaires seront réalisés.

Ce stage a mis en évidence l'importance de traiter les suspensions et solutions de (1,3)- β -D-glucanes avant leur dosage pour éviter une sous-évaluation de leur concentration. Selon les traitements utilisés, ces concentrations mesurées varient de façon importante. Il est également nécessaire de recourir à un traitement de décontamination du matériel pour éviter une surestimation de la concentration mesurée. Les deux méthodes les plus utilisées pour doser les (1,3)- β -D-glucanes sont la méthode au LAL et l'EIA, hors les résultats de ces deux méthodes ne peuvent pas être comparés (Iossifova *et al.*, 2008a). Il est nécessaire de standardiser les modes opératoires d'extraction des (1,3)- β -D-glucanes, de leur prétraitement et des conditions de dosage. Une standardisation de la procédure permettrait de comparer les résultats obtenus par les différentes équipes sur divers milieux professionnels et pourrait permettre la construction d'une banque de données. Par ailleurs, il n'y a pas de corrélation entre la concentration en (1,3)- β -D-glucanes et le dénombrement de ces spores (Iossifova *et al.*, 2008a). L'évaluation du risque lié à l'exposition aux moisissures ne peut pas être déterminée uniquement grâce à la mesure des spores dénombrables. Par la suite, les efforts seront concentrés sur le traitement par broyage cellulaire combiné au Tween 80. Différents paramètres comme le temps de traitement ou encore le type de broyeur (broyeur mécanique, agitateur orbital, broyeur haute pression...) devront être affinés pour permettre une amélioration du dosage des (1,3)- β -D-glucanes dans des bioaérosols générés en laboratoire puis dans des aérosols de terrains. De plus, des essais complémentaires seront réalisés pour comprendre l'impact d'un traitement alcalin sur les glucanes ainsi que sur leur dosage.

Références bibliographiques

- Adhikari, A., Gupta, J., Wilkins, J. R., Olds, R. L., Indugula, R., Cho, K. J., Li, C., Yermakov, M. (2011). Airborne microorganisms, endotoxin, and (1-3)-beta-D-Glucan exposure in greenhouses and assessment of respiratory symptoms among workers. *Annals of Occupational Hygiene* 55(3): 272-285.
- Adhikari, A., Lewis, J. S., Reponen, T., DeGrasse, E. C., Grimsley, L. F., Chew, G. L., Iossifova, Y., Grinshpun, S. A. (2010). Exposure matrices of endotoxin, (1→3)-β-d-glucan, fungi, and dust mite allergens in flood-affected homes of New Orleans. *Science of The Total Environment* 408(22): 5489-5498.
- Bønløkke, J., Stridh, G., Sigsgaard, T., Kjaergaard, S., Löfstedt, H., Andersson, K., Bonfeld-Jørgensen, E., Jayatissa, M., Bodin, L., Juto, J., Mølhav, L. (2006). Upper-airway inflammation in relation to dust spiked with aldehydes or glucan. *Scandinavian journal of work, environment and health* 32(5): 374-382.
- Bowman, S. M., Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28(8): 799-808.
- Chew, G. L., Douwes, J., Doekesgert, Higgins, K. M., Strien, R. V., Spithoven, J., Brunekreef, B. (2001). Fungal extracellular polysaccharides, beta-(1-3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor air* 11(3): 171-178.
- Dawson, M. E. (1995). A wealth of options: choosing LAL test method. *LAL update* 13(3).
- Douwes, J., Doekes, G., Montijn, R., Heederik, D., Brunekreef, B. (1996). Measurement of beta(1→3)-glucans in occupational and home environments with an inhibition enzyme immunoassay. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3176-3182.
- Douwes, J., McLean, D., van der Maarl, E., Heederik, D., Pearce, N. (2000). Worker exposures to airborne dust, endotoxin and beta-(1,3)-glucan in two New Zealand sawmills. *American Journal of Industrial Medicine* 38(4): 426-430.
- Fogelmark, B., Rylander, R. (1997). (1 → 3)-β-D-Glucan in Some Indoor Air Fungi. *Indoor and Built Environment* 6(5): 291-294.
- Foto, M., Plett, J., Berghout, J., Miller, J. D. (2004). Modification of the Limulus amoebocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379(1): 156-162.
- Foto, M., Vrijmoed, L. L. P., Miller, J. D., Ruest, K., Lawton, M., Dales, R. E. (2005). A comparison of airborne ergosterol, glucan and Air-O-Cell data in relation to physical assessments of mold damage and some other parameters. *Indoor Air* 15(4): 257-266.
- Hunter, K., Gault, R., Berner, M. (2002). Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters applied in microbiology* 35(4): 267-271.
- Iossifova, Y., Reponen, T., Daines, M., Levin, L., Hershey, G. K. K. (2008). Comparison of Two Analytical Methods for Detecting (1-3)-β-D-Glucan in Pure Fungal Cultures and in Home Dust Samples. *The Open Allergy Journal* 1(1): 26-34.
- Javmen, A., Grigiškis, S., Gliebutė, R. (2012). β-glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lysing enzymatic complex. *Biologija* 58(2): 51-59.
- Johnson, L., Smith, M. L., Begin, M., Fraser, B., Miller, J. D. (2010). Remediating office environments of spore-forming bacteria. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 7(10): 585-592.
- Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakata, Y., Kaku, M. (2009). Measurement of (1-3)-beta-D-glucan derived from different gauze types. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 217(2): 117-121.
- Laroche, C., Michaud, P. (2007). New Developments and Prospective Applications for (1,3) Glucans. *Recent Patents on Biotechnology* 1(1): 59-73.

- Ławniczek-Wałczyk, A., Górny, R. (2010). Endotoxins and β -glucans as markers of microbiological contamination--characteristics, detection, and environmental exposure. *Annals of agricultural and environmental medicine* 17: 193-208.
- Lee, S.-A., Liao, C.-H. (2014). Size-selective assessment of agricultural workers' personal exposure to airborne fungi and fungal fragments. *Science of the Total Environment* 466–467(0): 725-732.
- Madsen, A. M., Tendal, K., Schlunssen, V., Heltberg, I. (2012). Organic dust toxic syndrome at a grass seed plant caused by exposure to high concentrations of bioaerosols. *annals of occupational hygiene* 56(7): 776-788.
- McIntosh, M., Stone, B. A., Stanisich, V. A. (2005). Curdlan and other bacterial (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(2): 163-173.
- Nagi, N., Ohno, N., Adachi, Y., Aketagawa, J., Tamura, H., Shibata, Y., Tanaka, S., Yadomae, T. (1993). Application of Limulus Test (G Pathway) for the Detection of Different Conformers of (1,3)-beta;-D-Glucans. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 16(9): 822-828.
- Noss, I., Wouters, I. M., Bezemer, G., Metwali, N., Sander, I., Raulf-Heimsoth, M., Heederik, D. J. J., Thorne, P. S., Doekes, G. (2010). β -(1,3)-Glucan Exposure Assessment by Passive Airborne Dust Sampling and New Sensitive Immunoassays. *Applied and Environmental Microbiology* 76(4): 1158-1167.
- Reponen, T., Singh, U., Schaffer, C., Vesper, S., Johansson, E., Adhikari, A., Grinshpun, S. A., Indugula, R., Ryan, P., Levin, L., LeMasters, G. (2010). Visually observed mold and moldy odor versus quantitatively measured microbial exposure in homes. *Science of the Total Environment* 408(22): 5565-5574.
- Roslansky, P., Novitsky, T. (1991). Sensitivity of Limulus amebocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans. *journal of clinical microbiology* 29(11): 2477-2483.
- Saitô, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., Shibata, Y. (1991). Relationship between conformation and biological response for (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydrate Research* 217(0): 181-190.
- Samadi, S., Wouters, I. M., Houben, R., Jamshidifard, A.-R., Van Eerdenburg, F., Heederik, D. J. J. (2009). Exposure to inhalable dust, endotoxins, {beta}(1->3)-Glucans, and airborne microorganisms in horse stables. *The Annals of Occupational Hygiene* 53(6): 595-603.
- Sander, I., Fleischer, C., Borowitzki, G., Brüning, T., Raulf-Heimsoth, M. (2008). Development of a two-site enzyme immunoassay based on monoclonal antibodies to measure airborne exposure to (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan. *Journal of Immunological Methods* 337(1): 55-62.
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. (1999). Microbial (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers* 38(3): 247-253.
- Seo, S.-C., Grinshpun, S. A., Iossifova, Y., Schmechel, D., Rao, C. Y., Reponen, T. (2007). A new field-compatible methodology for the collection and analysis of fungal fragments. *Aerosol Science and Technology* 41(8): 794 - 803.
- Seo, S.-C., Reponen, T., Levin, L., Borchelt, T., Grinshpun, S. A. (2008). Aerosolization of Particulate (1 \rightarrow 3)- β -d-Glucan from Moldy Materials. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3): 585-593.
- Seo, S.-C., Reponen, T., Levin, L., Grinshpun, S. A. (2009). Size-fractionated (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan concentrations aerosolized from different moldy building materials. *Science of The Total Environment* 407(2): 806-814.
- Shogren, E. S., Park, J.-H. (2011). Pre-sampling contamination of filters used in measurements of airborne (1,3)-beta-d-glucan based on glucan-specific Limulus amebocyte lysate assay. *Journal of Environmental Monitoring* 13(4): 1082-1087.
- Sykes, P., Morris, R. H. K., Allen, J. A., Wildsmith, J. D., Jones, K. P. (2011). Workers' exposure to dust, endotoxin and [beta]-(1-3) glucan at four large-scale composting facilities. *Waste Management* 31(3): 423-430.

- Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Shibata, Y., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y. (1991). Activation of a limulus coagulation factor G by (1 → 3)-beta-d-glucans. *Carbohydrate Research* 218(0): 167-174.
- Thorn, J., Beijer, L., Rylander, R. (1998). Airways inflammation and glucan exposure among household waste collectors. *American Journal of Industrial Medicine* 33(5): 463-470.
- Wang, Q., Wood, P. J., Cui, W. (2002). Microwave assisted dissolution of β-glucan in water — implications for the characterisation of this polymer. *Carbohydrate Polymers* 47(1): 35-38.
- Wouters, I., Spaan, S., Douwes, J., Doekes, G., Heederik, D. (2006). Overview of personal occupational exposure levels to inhalable dust, endotoxin, beta(1-->3)-glucan and fungal extracellular polysaccharides in the waste management chain. *The annals of occupational hygiene* 50(1): 39-53.
- Wu, Y., Yao, M. (2010). Inactivation of bacteria and fungus aerosols using microwave irradiation. *Journal of Aerosol Science* 41(7): 682-693.
- Young, R. S., Jones, A. M., Nicholls, P. J. (1998). Conference Science Medal Lecture: Something in the Air: Endotoxins and Glucans as Environmental Troublemakers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50(1): 11-17.
- Young, S.-H., Castranova, V. (2005). *Toxicology of 1-3-beta-glucans : glucans as marker for fungal exposure*.

Annexe 1 : composition des milieux et solutions utilisés dans le cadre du stage

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Le milieu MEA est un milieu utilisé pour la recherche, la culture sur milieu gélosé, l'isolement ou le dénombrement des moisissures et des levures. Dans le cadre du stage, le milieu MEA est utilisé pour la culture de *P.brevicompactum*. Au laboratoire, ce milieu est préparé à partir d'un mélange de poudres pré-dosées (BD Difco™ Malt Agar) dont la composition finale est la suivante :

- Extrait de malt 30 g.L⁻¹
- Peptone mycologique 5 g.L⁻¹
- Agar 15 g.L⁻¹

Le pH du milieu doit être de 5,4. Pour préparer 1 L de ce milieu, il faut peser 45 g de poudre à solubiliser dans 1L d'eau ultrapure stérile.

Milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Le milieu YPD est un milieu riche utilisé pour la croissance des levures contenant :

- Bacto yeast extract 10 g.L⁻¹
- Bacto peptone 20 g.L⁻¹
- 20% de D-glucose 100 mL.L⁻¹
- Bacto Agar 15 g.L⁻¹

Pour la préparation des bouillons de YPD, la composition est la même mais sans ajout d'agar.

Le mélange de poudres est hydraté avec de l'eau ultrapure stérile.

- *Tous les milieux et solutions sont autoclavés à 121°C pendant 15 min. Chaque boîte contient 20 mL de milieu.*

Solution tryptone-sel (TS)

La solution tryptone-sel est utilisée lors de la dilution de cultures liquides de levures et de moisissures. Cette solution est un solvant isotonique préparée dans une fiole jaugée de 1L.

La composition de cette solution est la suivante :

- NaCl 8,5 g.L⁻¹ (Sodium Chlorure, PROLABO, France)
- Tryptone 1 g.L⁻¹ (Tryptone, OXOID-LP0042, Grande Bretagne)

Le volume final est ajusté à 1 L avec de l'eau ultrapure stérile.

Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)

Le tampon PBS est utilisé pour la mise en suspension de cellules. Dans le cadre de l'essai, son utilisation vise à maintenir la suspension de *S. cerevisiae* et la solution de laminarine à un pH neutre. Ce tampon est composé de :

- NaCl 8 g (Sodium Chlorure, PROLABO, France)
- KCl 0,2 g (potassium chlorure, PROLABO, France)
- Na₂HPO₄ 1,15 g (Sigma Aldrich, USA)
- KH₂PO₄ 0,2 g (Sigma Aldrich, USA)

Le pH est ajusté à 7,3 et le volume complété à 1L avec de l'eau ppi.

Résumé

Les (1,3)- β -D-glucanes sont des polymères de glucoses reliés par des liaisons (1,3). Ils peuvent être linéaire, ramifiés ou cycliques et proviennent des levures, moisissures, autres champignons, des plantes ou de certaines bactéries. Les glucanes sont présents dans les bioaérosols et provoquent différents symptômes (irritation des voies aériennes supérieures, atopie...) lorsqu'ils sont inhalés par le travailleur exposés. Ces polymères peuvent être dosés par la méthode au LAL. L'influence de six traitements sur le dosage des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL ont été testés (sans traitement, broyage cellulaire, autoclavage, sonication, traitement alcalin et traitement au Tween) sur deux suspensions cellulaires (*S. cerevisiae*, *P. brevicompactum*) et trois solutions de glucanes purs en poudre (glucanes de l'orge, laminarine, schizophyllan). Parmi ces traitements, le broyage cellulaire est le plus efficace d'autant plus s'il est suivi d'un traitement au Tween. Des essais complémentaires seront réalisés pour optimiser ces traitements. Avant chaque mesure, le matériel doit obligatoirement être décontaminé par sonication dans l'éthanol pendant deux heures.

Abstract

(1,3)- β -D-glucanes are glucose polymers connected with (1,3) linkage. They can adopt different conformations: linear, circular or branched. They are the major component of fungi cell wall but also found in some plants or bacteria. Glucan airborne exposure can be associated with upper airway inflammation or atopy. This kind of biopolymers can be assayed using the LAL method. Influence of six treatments on the assay has been tested (untreated, cell grinding, autoclaving, sonication, alkaline treatment and Tween 80 treatment). We used two cell suspension models; *S. cerevisiae* and *P. brevicompactum*; and three pure glucans models; glucans from barley, laminarin and schizophyllan). The most efficient treatment was cell grinding in addition to Tween 80 treatment. Additional tests will be performed to optimize these treatments. For good practice, each material has to be decontaminated using sonication in ethanol for two hours.